UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE DARMFLORA VON DYSDERCUS FASCIATUS SIGN. (HEM., PYRR.).

Vergleich
von normal und keimfrei aufgezogenen Tieren,
mit besonderer Berücksichtigung
des Proteinstoffwechsels.

INAUGURALDISSERTATION

zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
KÄTHI GEERING-SACHER

Basel, 1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546026_0073

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE DARMFLORA VON DYSDERCUS FASCIATUS SIGN. (HEM., PYRR.).

Vergleich
von normal und keimfrei aufgezogenen Tieren,
mit besonderer Berücksichtigung
des Proteinstoffwechsels.

INAUGURALDISSERTATION

zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
KÄTHI GEERING-SACHER

Basel, 1972

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	3
2. Normale Zucht- und Haltungsbedingungen	7
3. Bakteriologische Untersuchungsmethoden	8
3.1. Darmpräparation	
3.2. Ausstriche	
3.3. Kulturen	
4. Normalbestand der Darmflora	10
4.1. Allgemeines	
4.2. Ausstrichuntersuchungen	
4.3. Züchtung isolierter Keime und Verteilung im 2. und 3.Ventrikel	
4.4. Infektionsmodus	
4.5. Dynamik des Keimbestandes	
5. Versuche zur Elimination der Keime und zur Futtersterilisation	15
5.1. Verabreichung antibakterieller Stoffe	
5.2. Versuche zur Sterilisation des Normalfutters	
6. Aufzucht keimfreier Tiere	25
6.1. Sterilisation der Eier	
6.2. Sterilisation des Futters	
6.3. Haltung der Tiere	
6.4. Einfluss des sterilisierten Futters auf das normal infizierte Tier	
6.5. Vergleich zwischen normal infizierten und keimfreien Tieren	
6.6. Reinfektionsversuche	
7. Proteasebestimmungen	33
7.1. Methode	
7.2. Proteasenaktivität bei Standardtieren	
7.3. Vergleich der Proteasenaktivität bei Standard- und keimfrei aufgezogenen Tieren	
8. Hämolymphproteine	41
8.1. Methode	
8.2. Allgemeine Kenntnisse über Hämolymphproteine	
8.3. Hämolymphproteinmuster bei Dysdercus fasciatus	
9. Diskussion	51
Zusammenfassung	56
Literaturverzeichnis	58

UNIV. LEIDEN BIBL.

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Untersuchungen der Wechselbeziehungen zwischen Mikroorganismen und Insekten sind die Grundlage der Symbioseforschung in der Entomologie.Buchner(1953) prägte das Wort 'Endosymbiose' für das innige Zusammenleben zweier verschieden gearteten Partner,deren wechselseitige Anpassung so ausgeprägt ist,dass man annehmen darf,es handle sich dabei für den Wirtsorganismus um eine nützliche Einrichtung.

Viele Arbeiten untersuchten die Bedeutung dieser Symbiosen, und es fiel auf,dass sich die Verbreitung symbiontischer Einrichtungen bei Insekten mit ihrer Einordnung in ernährungsphysiologische Kategorien deckt.So fand man,dass alle Pflanzensauger,mit vereinzelten Ausnahmen,und alle ausschliesslichen Blutsauger eine obligate Symbiose eingehen(Koch 1962).

Die Wohnstätten der Symbionten im Wirtsorganismus sind sehr vielfältig.Dort wo der Sinn des Zusammenlebens in einer unmittelbaren Beeinflussung der Nahrung durch Enzyme von Mikroorganismen liegt,ermöglicht eine diffuse Durchsetzung der Nahrung im Darm die beste Ausnützung(Buchner 1953).Eine solche Unterbringung garantiert aber keine grosse Sicherheit für eine dauernde und gleichbleibende Besiedlung.Der Bestand wird oftmals geschützt durch Verlagerung in die Zellen,oder durch Neubildungen,wie Krypten und Mycetome,die eine bessere Fixierung der Symbionten ermöglichen.

In diesen Fällen wird die gegenseitige Bindung immer stärker, und die Symbionten werden bald zu lebensnotwendigen Begleitern des Wirts.

Die Umwandlungen der symbiontischen Wohnstätten stellen zusammen mit der Nahrungsspezialisierung des Insekts eine phylogenetische Entwicklung dar.Sie lässt sich besonders gut an den Hemipteren verfolgen.Im Verlauf der Stammesgeschichte sind die Wanzen zu recht verschiedenen Nahrungsquellen übergegangen.Die Urformen waren carnivore Tiere,die allmählich zu phytophager Lebensweise übergingen.Bei den Homopteren hat dieser Nahrungswechsel im ganzen Stamm stattgefunden,und man findet bei ihnen fast ausnahmslos

Symbionten(Schneider 1940).Bei den Heteropteren scheint dieser Prozess noch nicht beendet zu sein,und man findet alle Uebergänge vom fleischfressenden zum pflanzensaugenden Typ,der damit auch je nach vorwiegender Ernährungsweise symbiontische Einrichtungen besitzt oder nicht.Ehrhardt(1968) unterscheidet bei den Pflanzensaugern auch die Phloembibitoren,die am Siebröhrensaft saugen mit obligater Symbiose,und die Lokalbibitoren,die am Parenchym saugen mit häufig fehlender Symbiose.Daneben stellt er die blutsaugenden Wanzen,die aber nur Symbiontenträger sind,wenn sie sich ausschliesslich von Vertebratenblut ernähren.Die von Blut und Siebröhrensaft lebenden Insekten können ihren Nahrungsbedarf nur mit Hilfe von Symbionten decken,weil dieses Futter für ihre Entwicklung mangelhaft ist.Dagegen dürften in pflanzlichen Parenchymzellen alle essèntiellen Stoffe in ausreichender Menge vorhanden sein.

Nach Buchner verlangen die Pyrrhocoriden,zu denen auch die hier untersuchte Art D y s d e r c u s f a s c i a t u s (Sign.) gehört,unter den Heteropteren eine besondere Behandlung.'Auffällige Bakterienwohnstätten gehen dieser Familie,in der die tierische Kost offenbar noch eine sehr wesentliche Rolle spielt,ab.' Pyrrhocoris apterus,wie auch Dysdercus fasciatus besitzen zwar im weiblichen Geschlecht am Ende des Mitteldarms einige Ausstülpungen,wie sie sonst niemals bei Heteropteren ohne Symbionten vorkommen,aber sie enthalten keine Bakterien.Bei Dysdercus suturellus fand Glasgow(1914) an gleicher Stelle besser entwickelte, diesmal aber bakterienbesiedelte Blindsäcke.

Die im ersten,magenartig erweiterten Mitteldarmabschnitt vorkommenden Keime bei Dysdercus fasciatus,die immer von gleicher Gestalt sind(Kuskop 1923),werden von Buchner den bei andern pflanzensaugenden Heteropteren mit viel Aufwand untergebrachten Symbionten gleichgestellt.Kuskop(1923),Schneider(1940) und Ehrhardt (1968) sprechen ihnen ebenfalls eine symbiontische Funktion zu, wobei diese natürlich von primitiver Art wäre.

Es schien somit interessant,die Bedeutung dieser Bakterien zu untersuchen,besonders,da die Pyrrhocoriden am Anfang einer Entwicklung stehen.Einerseits zeigen sie bereits Neubildungen zur

Unterbringung von Symbionten,die aber noch nicht besiedelt sind und andererseits haben sie die phytophage Lebensweise,bis auf zeitweiligen Kannibalismus,den ich selbst beobachten konnte, übernommen.

Aus diesen Angaben lassen sich folgende Kategorien von Symbiosenformen ableiten: 1.Mikroorganismen in besonderen Wohnstätten mit transovarieller Uebertragung,die eine ausgeprägte Endosymbiose darstellen und 2.Mikroorganismen im Darmlumen,die entweder spezifische Leistungen an den Wirt vollbringen,oder dann nur unspezifische Leistungen,die einem Kommensalismus entsprechen.

Endogene Symbiosen sind gut untersucht,und einige Stoffwechselbeziehungen zwischen Symbionten und Wirt konnten gesichert nachgewiesen werden.Die Bedeutung der Symbiose liegt oft in einer Wuchsstofflieferung,die vorallem die Vitamine der B-Gruppe betrifft(Zusammenfassung Buchner 1953,Wigglesworth 1959).Andere Symbioseleistungen,wie Umwandlung von Schwefel in organische Form(Ehrhardt 1968),Coenzymbildung(Brooks 1955),Stickstoffassimilation(Tóth 1951) sind bis heute nur Hypothesen geblieben.

Die Untersuchungen der freien Darmflora bei Insekten sind daneben recht spärlich.Obwohl Buchner eine aktive Beteiligung der Darmmikroorganismen an der Verdauung postuliert,fehlt dazu meist eine einwandfreie experimentelle Bestätigung.Hellmuth(1956) isolierte bei Trypetiden einen Pseudomonas-Keim aus dem Darm,der fähig ist,Harnsäure und Harnstoff umzubauen und Eiweissverbindungen über aldehydartige Substanzen abzubauen.Busnel und Drilhorn(1948) und Kaudewitz(1953) beobachteten,dass die Darmbakterien bei Tenebrio molitor Wuchsstoffe synthetisieren,die immerhin bei reiner Mangeldiät noch ein gewisses Wachstum ermöglichen. Im weiteren ist auch ein Abbau von Zellulose durch Darmbakterien bei vielen holzbohrenden Insekten bekannt(Hawker 1962).

Bei den Heteropteren finden wir eine Darmsymbiose vorallem bei der blutsaugenden Wanze Rhodnius(Wigglesworth 1936) und Triatoma (Halff 1956),welche als Folsäure-Lieferanten angesehen werden. Tóth(1950,1951) beschreibt eine Stickstoffassimilation aus der Luft von Kulturen von Mikroorganismen aus Pyrrhocoris und postliert eine zusätzliche Eiweissquelle für das Tier durch die Auf-

lösung degenerierender Symbionten.Andererseits konnte Ford(1962) bei Dysdercus fasciatus keine Proteasen finden,und so war es naheliegend,die Bedeutung der Bakterien auch in einer Verdauungshilfe zu suchen,und damit eine einfache Symbioseleistung zu bestätigen.

Um die bisher nicht vollständig übereinstimmenden Befunde zu klären,sind Untersuchungen mit folgenden Fragestellungen durchgeführt worden:

a) Zeigt sich bei den im Darm von Dysdercus fasciatus vorkommenden Mikroorganismen eine Konstanz in quantitativer und qualitativer Hinsicht im Laufe der verschiedenen Altersstadien?

b) Können die verschiedenen Keime in bekannten Standard-Kulturmedien gezüchtet werden?

c) Gelingt es keimfreie Versuchstiere von Dysdercus fasciatus zu züchten?

d) Zeigen sich bei Keimfreiheit besondere Ausfallserscheinungen?

e) Sind Differenzen in der Proteasenaktivität und in der Zusammensetzung der Hämolymphproteine zwischen normal gehaltenen und keimfreien Tieren vorhanden,die auf Veränderungen des Proteinstoffwechsels deuten würden?

Um diesen Fragenkreis zu bearbeiten,war die Anwendung der verschiedensten Untersuchungstechniken notwendig.Die Methodenbeschreibung wurde deshalb vorteilhafterweise den einzelnen Kapiteln beigefügt.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn PD Dr.M.Reiff durchgeführt.Für sein stetiges Interesse und seine wertvollen Anregungen möchte ich meinem verehrten Lehrer herzlich danken.Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof.Dr.med. H.Löffler,der mir in zuvorkommender Weise ermöglichte,meine bakteriologischen Arbeiten im Institut für Mikrobiologie und Hygiene durchzuführen.Weiterhin möchte ich der Firma Ciba-Geigy AG Basel meinen Dank aussprechen,die mir weitgehend das Tiermaterial zur Verfügung stellte und mir erlaubte,die Protease- und Hämolymphproteinbestimmungen in ihren Labors durchzuführen.Für die hilfreichen Anregungen danke ich im besonderen auch Herrn Prof.Dr. A.Aeschlimann und Herrn Dr.P.Erb.

2. NORMALE ZUCHT- UND HALTUNGSBEDINGUNGEN

D y s d e r c u s f a s c i a t u s (Sign.) gehört als Hemiptere zur Familie der Pyrrhocoriden.Unter konstanten Zuchtbedingungen erreicht dieses hemimetabole Insekt innert 26-32 Tagen nach 5 Larvenstadien das Imaginalstadium.Nach zwei Tagen erfolgt eine 3-4 tägige Kopulation,nach der das Weibchen das erste Eigelege abgibt.Weitere 2-3 Gelege folgen in Abständen von 3-5 Tagen.Die maximale Lebensdauer beträgt 45-65 Tage.Die Eier reifen in 7 Tagen aus.

Als Ausgangsmaterial für meine Untersuchungen dienten Eier aus der Grosszucht der Firma Ciba-Geigy AG Basel.Die Zucht der Versuchstiere erfolgte in einem Plastikgehäuse von $1m^3$ Volumen,das in einem Raum mit annähernd konstanter Temperatur von $25^{o}C$ stand. Mit Hilfe von zwei 25W Glühbirnen und einer grossen Wanne Wasser, die durch ein Heizkissen leicht erwärmt wurde,gelang es,eine konstante Temperatur von $27^{o}C$ und eine rel.Luftfeuchtigkeit von 7o% zu erreichen.Die Tiere wurden bei Dauerbeleuchtung gehalten.In diesem Gehäuse wurden Gruppen von 3o-5o Tiere in Glasschalen untergebracht.Als Deckel diente der obere Teil einer Petrischale oder Nylongaze.Adulten Tieren wurde sterile,angefeuchtete Erde in die Glasschale gegeben,in die die Weibchen mit Vorliebe ihre Eier legen.Auf diese Art konnte eine gute Uebersicht und Kontrolle der Entwicklungsstadien sowie des Gesundheitszustandes erreicht werden.

Als Nahrung wurden Baumwollsamen verabreicht,die im Mixer zerkleinert und im Kühlschrank aufbewahrt wurden.Dieses Samenschrot wurde bei Gebrauch mit etwas Wasser zu einem dicken Brei angerührt und in kleinen selbstgefertigten Alu-Folienschälchen den Tieren täglich frisch vorgesetzt.Die im Brei aufgeschlossenen Nährstoffe deckten den Nahrungs- und Flüssigkeitsbedarf vollständig.

3. BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

3.1. Darmpräparation

Der Mitteldarm von Dysdercus fasciatus kann in drei Regionen eingeteilt werden, einem grossen, dünnwandigen 1. Ventrikel, einem langen, dünnen 2. Ventrikel und einem magenartig erweiterten 3. Ventrikel. Für die bakteriologische Untersuchung wurde dem abgeflammten Tier mit ausgekochten oder ausgeglühten Pincetten der 2. und 3. Ventrikel gesondert herauspräpariert. Diese wurden nun direkt in Nährbouillon gebracht oder in Ausstrichpräparaten begutachtet. Bei Tieren im ersten Larvenstadium war es kaum möglich, Darmabschnitte getrennt zu untersuchen, da der Darminhalt beim Anfassen mit der Pincette sofort ausfloss.

3.2. Ausstriche

Für allgemeine Uebersichten und für die Bestimmung von Gram positiven Keimen aus der Kultur wurden Ausstrichpräparate gemacht. Im ersteren Falle wurde der Darminhalt auf einen entfetteten und abgeflammten Objektträger ausgedrückt und mit einem Tropfen steriler, physiologischer Kochsalzlösung mit Hilfe einer ausgeglühten Oese zu einer dünnen Schicht verrührt. Nach Lufttrocknung und dreimaligem Abflammen des Objektträgers wurde das Präparat nach Gram gefärbt. Für die Bestimmung von Gram positiven Bakterien entnahm man die Keime direkt aus den Kolonien der Kulturplatten und verfuhr im weiteren wie oben.

3.3. Kulturen

Die Züchtung der Bakterien erfolgte in Trypticase-Bouillon, die nach der Beimpfung während 24 Stunden bei 38°C inkubiert wurde. Nach dieser Zeit wurden die gewachsenen Keime auf Mc Conckey und Blutagarplatten ausgestrichen. Nach 24 std. Bebrütung konnten die einzelnen Kolonien isoliert werden. Die verschiedenen, auf der Mc Conckey-Platte gewachsenen Gram positiven Keimkolonien, wurden nun mit Hilfe der 'Bunten Reihe' biochemisch bestimmt (geprüft wurden

Urea,Mannit und Gas,SIM=Sulfit,Indol und Beweglichkeit,Citrat, KIA=Glukose,Laktose und Beweglichkeit).Die Prüfung auf Gram pos. Keime,die auf der Blutagarplatte wachsen,erfolgte mittels Ausstrichpräparaten.Bei diesem Vorgang werden die aeroben Keime erfasst.Um eventuell vorhandene,anaerobe Keime zu ermitteln,wurden einige Prüfungen in Thioglycollat-Bouillon und im Anaerobiertopf durchgeführt.

Bei den Bestimmungen wurde auf eine genaue Spezifizierung der Bakterienarten verzichtet,ausser bei Streptokokken,wo mit Hilfe des Aesculintests Enterokokken ermittelt werden konnten.

4. NORMALBESTAND DER DARMFLORA

4.1. Allgemeines

Greenberg(1963) untersuchte bei der Hausfliege die Beziehungen zwischen der Darmflora und dem Insekt,hinsichtlich einer Vitaminproduktion seitens der Bakterien.Er fand unter anderem Proteus vulgaris,Aerobacter aerogenes,Escherichia coli,Bacillus subtilis, Salmonella typhi,Staphylococcus aureus und Streptococcus lactis. Alle diese Keime sind Vitamin-B-Lieferanten,deren Produktion der Fliege aber nicht zugutekommen.

Eine ältere Arbeit(Bitter 1949) befasst sich mit den Darmbakterien bei Periplaneta,als mögliche Infektionsquelle für den Menschen.Dabei wurden im Darm verschiedene Coli,Aerobacter,Paracolobacter,Proteus,Alcaligenes,Pseudomonas und Salmonellen beobachtet.Es wird hier auch hervorgehoben,dass die Bakterienflora der Insekten stark abhängig ist von der Ernährung und der Umgebung.

Für die Feuerwanze,Pyrrhocoris apterus,die wie Dysdercus zu den Pyrrhocoriden gehört,gibt Buchner(1953) eine starke Symbiontenbesiedlung des magenartigen Darmabschnittes(3.Ventrikel) an, deren Keime,immer von gleicher Gestalt,bald in grossen Ballen zusammenliegen,bald den Speisebrei allseitig durchsetzen.Das war der Ausgangspunkt für eigene Untersuchungen,wobei dieser Befund bei Pyrrhocoris und Dysdercus mit Hilfe von Ausstrichpräparaten bestätigt werden konnte.Neben den beschriebenen Keimen liessen sich jedoch noch andere Bakterienarten unterscheiden.

4.2. Ausstrichuntersuchungen

Um ein Bild über die Veränderungen der Darmpopulation während des Lebenszyklus zu bekommen,wurden Tiere vom ersten Tag nach dem Schlüpfen bis zum Adultstadium in kurzen Abständen geprüft.

In Ausstrichpräparaten,die nach Gram gefärbt wurden,findet man im 2. und 3.Ventrikel vorallem Gram pos. Keime während des ganzen Lebens.Das Bild ist oftmals durch die Speisereste stark beeinträchtigt,sodass die viel kleineren Gram negativen Keime nicht genau unterschieden werden können.In allen Altersstadien,bei Männchen und Weibchen,findet man kokkenartige Bakterien,die einzeln oder

in Teilung als Kettchen vorkommen,sowie Gram pos. Stäbchen.

Schon hier werden individuelle Schwankungen und oder Variationen der Bakterienpopulation,bedingt durch den Füllungszustand des Darmes,ersichtlich.

Bei älteren Tieren scheinen die Bakterien eine geringere Teilungsaktivität zu haben,was durch weniger Gram pos. Kokkenkettchen zum Ausdruck kommt.

4.3. Züchtung isolierter Keime und Verteilung im 2. und 3.Ventrikel

Im weiteren sollen nun die Resultate aus den Züchtungsversuchen besprochen werden.

Anfänglich wurden der 2. und 3.Ventrikel getrennt untersucht. Es bestätigte sich aber immer wieder,dass keine qualitativen Unterschiede in der Bakterienpopulation der beiden Darmabschnitte vorhanden sind,sodass die Resultate in der Tabelle 1 zusammengefasst wurden.

Die Verteilung der Keime im 2. und 3.Ventrikel scheint bei den untersuchten Tieren eher willkürlich,und es können nur geringfügige Veränderungen während der Lebensdauer des Insekts beobachtet werden(Tab.1).Die Anzahl der vorkommenden Keimarten scheint im Alter eher zuzunehmen,was aber auch nur auf der besseren Erfassbarkeit durch die Züchtung,bei einem grösseren 3.Ventrikel beruhen kann.Während des ganzen Lebens können Enterokokken nachgewiesen werden,die mit den Keimen der Ausstrichpräparate und vermutlich auch mit denjenigen Buchners identisch sind.Als weiteren Gram pos. Keim kann man vom 2. Larvenstadium an Laktobazillus nachweisen.Daneben kommen Gram neg. coliforme und nicht coliforme Keime vor.Während die nicht coliformen Keime,wie Bethesda ballerup und Pseudomonas in den ersten zwei Larvenstadien häufiger anzutreffen sind,nehmen danach die coliformen Keime,wie E.coli und Klebsiella,überhand.

Weitere selten vorkommende Keime sind Proteus und Paracoli.

Vermutlich kommen während des ganzen Lebenszyklus alle Keime vor,jedoch ändert sich die quantitative Verteilung,sodass gewisse Bakterienarten zeitweise nicht mehr durch die Züchtung erfasst werden können.

		GRAM -						GRAM +	
		nicht coliforme			coliforme				
Alter der Tiere	Anzahl Tiere	Ballerup	Pseudomonas	Proteus	E.coli	Klebsiella	Paracoli	Enterokokken	Laktobazillen
f.g.	6	50%	17%	17%	-	67%	-	50%	-
2.Tag	5	60	20	-	20	-	-	100	-
3.Tag	7	86	86	-	14	14	-	86	-
5.Tag	6	67	50	-	17	-	34	67	-
6.Tag	8	50	50	-	62	25	-	100	-
7.Tag	6	17	83	-	83	34	-	100	-
8.Tag	6	100	66	-	100	100	-	83	16
11.Tag	13	76	38	-	69	92	-	92	15
Mitte 4.L.	8	100	25	-	-	100	-	100	25
Ende 4.L.	6	16	66	16	100	100	-	100	100
Weibchen	12	33	8	8	100	50	8	91	66
Männchen	4	100	-	-	75	100	-	100	50

TABELLE 1 : Häufigkeit der im Darmtrakt nach 3.3. ermittelten Mikroorganismen in Prozenten zur Anzahl der in verschiedenen Altersstadien untersuchten Tiere. f.g.=frischgeschlüpft, L.=Larvenstadium.

Im Ganzen wurden 98 Tiere untersucht.Die Häufigkeit des Vorkommens der verschiedenen,isolierten Gattungen ist wie folgt:

Enterokokken	88	Pseudomonas	44
E.coli	6o	Laktobazillus	27
Ballerup	55	Paracoli	6
Klebsiella	54	Proteus	3

In der Population des 2.Ventrikels sind keine Unterschiede festzustellen,hinsichtlich der Gram neg. Keime,während die Gram pos. Keime weniger häufig anzutreffen sind,als im 3.Ventrikel.

Weder im 2. noch im 3.Ventrikel konnten anaerobe Keime gefunden werden.

Alle diese Keime sind,mit Ausnahme der Enterokokken und eventuell Laktobazillen,gewöhnliche Luft- und Bodenkeime,die überall anzutreffen sind und teilweise auch in der normalen Darmflora des Menschen vorkommen.

Proteus,Escherichia coli und Laktobazillus sind Vitamin-B-Produzenten und Pseudomonas,Proteus und Enterokokken aktive Proteasenausscheider.Die Voraussetzung für eine symbiontische Leistung an das Insekt wäre mit diesen Eigenschaften gegeben.

4.4. Infektionsmodus

Bei den Heteropteren wird oft eine Beschmierung der Eier mit Kot unmittelbar nach der Eiablage beobachtet(Buchner 1953).Diese Form der Uebertragung der Symbionten ist auch wahrscheinlicher bei einer im Darmlumen lokalisierten Symbiose,als eine transovarielle Infektion.

Um bei Dysdercus den Infektionsmodus abzuklären,wurden die Embryonen aus den Eiern herauspräpariert und auf ihre Sterilität geprüft.Alle Untersuchungen,auch diejenigen auf anaerobe Keime, fielen negativ aus,d.h.der Embryo ist noch vollständig steril. Gleiche Keime wie im Darm des Weibchens konnten aber auf der Eioberfläche und im dunklen Kot des Muttertieres nachgewiesen werden.Es konnte ebenfalls eine sogenannte 'Ruhezeit' der frisch geschlüpften Larven auf den leeren Eischalen beobachtet werden, während der Heteropteren nach Buchner die Eihüllen mit dem Saug-

rüssel abtasten und dabei die Symbionten aufnehmen.Alle diese Umstände deuten darauf hin,dass es sich bei Dysdercus ebenfalls um eine Uebertragung der Bakterien durch Eibeschmierung handelt und nicht um eine transovarielle Infektion.Dass die Tiere überhaupt Keime von der Mutter übernehmen und nicht einfach vom Futter oder der Umgebung infiziert werden,kann man an den Enterokokken beweisen,die nur im Darm vorkommen.Weiterhin zeigen Tiere,die während fünf Tagen in steriler Umgebung ohne Futter belassen wurden,im Mitteldarm trotzdem zahlreiche Bakterien.

4.5. Dynamik des Keimbestandes

Obwohl die Darmflora bei Dysdercus ziemlich unspezifisch erscheint,finden wir immer wieder die gleichen Keimarten.Einige davon,wie z.B. Enterokokken,können mit einer grossen Konstanz während des ganzen Lebens nachgewiesen werden.Diese letztgenannten Organismen scheinen quantitativ immer vorzuherrschen und andere Keime,durch ein Selektionsprinzip,in ihrer Zahl zurückzudrängen.

Das Insekt nimmt aus dem Futter und der Umgebung,neben den nachgewiesenen,unzählige andere Mikroorganismen auf,die sich aber nicht oder nur zufällig ansiedeln können im Darm.Demgegenüber besteht für einige Keimarten(Tab.1) offensichtlich eine Toleranz, mit dem,in allen Stadien vorherrschenden Bestand an Enterokokken zu existieren.Diese Arten unterliegen dann ihrerseits,je nach ihrer Verteilung,quantitativen Schwankungen.Somit wird die Bakterienpopulation schon durch die Infektion von der Eioberfläche bestimmt.

Andererseits wird auch argumentiert,dass der Darm selbst antibakterielle Effekte ausüben kann,um fremde Bakterien bei der Darmpassage zu eliminieren(Day und Waterhouse 1953).

Auf alle Fälle lassen sich Wechselbeziehungen zwischen Mikroorganismen und Insekt feststellen,unabhängig,ob das Verhältnis der Partner symbiontisch oder kommensalistisch ist.

Um Anhaltspunkte über diese Problemstellung zu bekommen,wurde versucht,einerseits die Intestinalflora bei Dysdercus zu eliminieren,oder die Tiere unter sterilen Zuchtbedingungen keimfrei aufzuziehen.

5. VERSUCHE ZUR ELIMINATION DER KEIME UND ZUR FUTTERSTERILISATION

5.1. Verabreichung antibakterieller Stoffe

Um die eventuelle Bedeutung einer Symbiose für ein Insekt zu erfassen,muss die oft enge Bindung zwischen Symbiont und Wirt gesprengt werden.Dazu wird mit verschiedenen Methoden versucht,die Mikroorganismen aus dem Tier zu eliminieren.Auf Grund der Ausfallserscheinungen,die dann am Wirt auftreten,können Aussagen gemacht werden über das Verhältnis zwischen Insekt und Symbiont.Je nach dem Wohnsitz der Symbionten im Wirtsorganismus und den Verhältnissen bei der Uebertragung der Symbionten auf die Nachkommen, wird eine der folgenden Methoden gewählt zur Ausschaltung der Mikroorganismen: Zentrifugieren der Eier und Verlagerung der Symbionten,Desinfizieren der Eischale,Kälte- und Wärmebehandlung der Wirtstiere,Injektion oder Verfütterung bakterizider oder bakteriostatischer Stoffe.

Diese letztere Methode wurde schon von mehreren Autoren mit Erfolg angewendet,so z.B. von Glaser(1947) mit Sulfathiazol und Penicillin bei Periplaneta americana,von Frank(1956) mit Penicillin,Aureomycin,Chloromycetin,Streptomycin und Aerosporin bei Periplaneta orientalis und von Ehrhardt und Schmutterer(1966) mit Tetracyclin,Chloramphenicol,Erythromycin und Penicillin bei Aphis fabae Scop..Alle diese Autoren erzielten durch Antibiotika-Verabreichung eine vollständige Elimination der Symbionten.

Deshalb wurde versucht,die Darmflora von Dysdercus durch orale Verabreichung von antibakteriellen Stoffen zu eliminieren.

5.1.1. Verwendete antibakterielle Stoffe

Die Antibiotika und Chemotherapeutica Terramycin(Base Pfizer), Aureomycin(Chlortetracyclin HCl,Lederle),Vibramycin,Penicillin (K-Penicillin G,Lilly und Spécilline G,Specia),Bacitracin,Bactrim (Roche),Sulfamerazin,Irgafen und Sulfadimidin wurden in Pulverform verabreicht,während Garamycin(Schering) als Lösung zur Anwendung kam.

Die Stoffe wurden in den Konzentrationen o,o1%,o,1% und 1% oral im Futter verabreicht.Eine Konzentration von o,o1% wird von Ehrhardt und Schmutterer(1966) als physiologisch betrachtet.

Die abgewogenen Antimicrobia wurden mit einem Spatel sorgfältig unter das feine Futterschrot gemischt und anschliessend noch mit dem Mixer verrührt.Diese Mischungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt,und täglich die erforderlichen Portionen mit etwas Wasser zu einem dicklichen Brei angerührt.Einzig Garamycin,das als verdünnte Lösung im Kühlschrank aufbewahrt wurde,musste täglich zu einer abgewogenen Menge Futter pipettiert werden.

5.1.2. Nebeneffekte antibakterieller Stoffe in verschiedenen Lebensphasen von Dysdercus

Als Kriterien für eine Untersuchung der toxischen Einflüsse auf das Versuchstier durch antibakterielle Stoffe gelten die Entwicklungsdauer,die Sterblichkeit,die Anzahl Eier und einige andere Ausfallserscheinungen.

Entwicklungsdauer: Als Mass für die Entwicklungsdauer wurde die Fläche der Häutungs/Zeit-Kurve genommen(Tab.2 und Abb.I).Bei 2-3 Versuchen wurde gemittelt,bei einem Versuch wurde der Einzelwert verwendet.Die Normalwerte stellen einen Mittelwert aus 6 Versuchen dar.

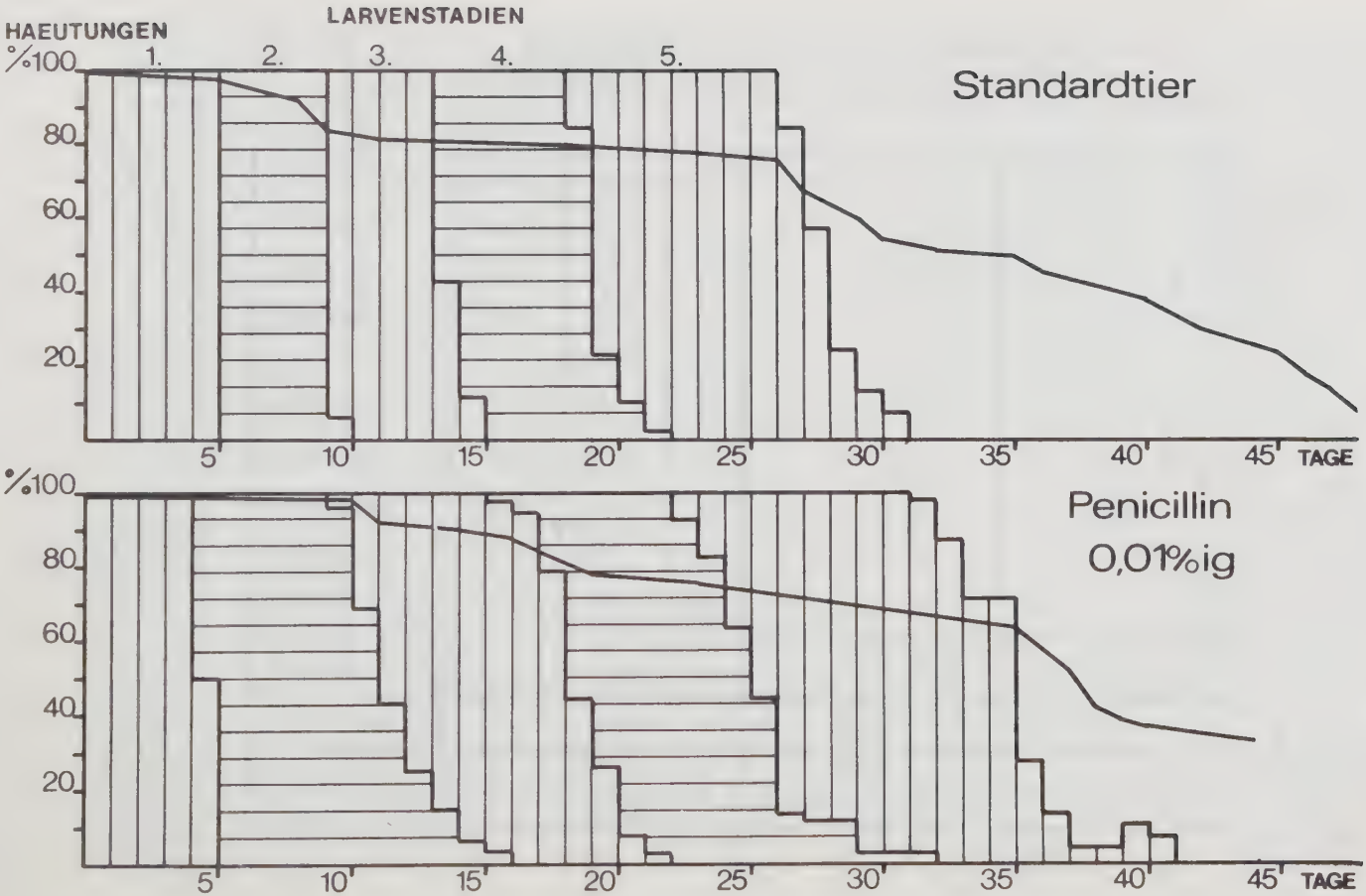
Aus Tab.2 ist ersichtlich,dass die Auswirkungen der antibakteriellen Stoffe mit steigender Konzentration zunehmen.Sogar bei der 'physiologischen' Konzentration von o,o1% ist eine leichte Verlängerung der Larvalentwicklung festzustellen(Abb.I)bei allen verabreichten Substanzen,ausser Aureomycin und Vibramycin.Die stärkste Wirkung bei einer Konzentration von o,o1% und 1% hat Terramycin.Den grössten entwicklungshemmenden Einfluss bei 1% iger Verabreichung haben Penicillin und Terramycin.

Sterblichkeit: Die Auswirkungen der antibakteriellen Substanzen auf die Sterblichkeitsrate sind weniger eindeutig.Vorallem bei 1%igen Gaben zeigt sich eine stark erhöhte Mortalität,wie aus Tab.2 ersichtlich ist.Hier sind vorallem Aureomycin,Irgafen und Bactrim zu nennen,deren 14-,24-bzw.26-tägige Verabreichung bereits eine loo% ige Sterblichkeit bewirkt(Abb.I).Bei den meisten Versuchen mit Konzentrationen von o,o1% und o,1% ist die Lebensdauer nicht stark beeinflusst.

Eizahl: Bei Weibchen,die mit o,o1% igem Antibiotika- bzw.Chemotherapeutica-Futter ernährt wurden,konnten 2-3 Eigelege mit meist normalen Eizahlen beobachtet werden,ausser mit Aureomycin,wo kei-

	Entwicklungsdauer			50% Sterblichkeit Tag		Eigelege	
Normaltier	291 (275-307)			36±2		+++	
Antimicrobia Kons.	0,01%ig	0,1%ig	1%ig	0,1%ig	1%ig	0,01%ig	0,1%ig
Terramycin	368	410	45.	36	31	+++	0
Aureomycin	307	340	140	37	3	0	(+)
Sulfamerazin	337	335	360	33	34	+(+)(+)	(+)
Vibramycin	303	328	-	40	-	+++	(+)
Penicillin	317	347	309	26	5	+-(+)	+
Bactrim	305	369	268	7	11	++(+)	(+)
Bacitracin	311	322	330	35	12	++(+)	++(+)
Irgafen	329	350	285	36	14	+(+)(+)	(+)
Sulfadimidin	311	326	352	40	29	++(+)	+(+)(+)
Garamycin	285	295	-	36	-	+(+)	+(+)

TABELLE 2 : Einfluss von Antimicrobia auf Entwicklungsdauer(Fläche der Häutungs/Zeit-Kurve),Sterblichkeit und Eigelege.
+ = Eigelege,(+) = Eigelege mit verminderter Eizahl.


HAEUTUNGEN
LARVENSTADIEN
%100
80
60
40
20
1.
2.
3.
4.
5.
Standardtier
5
10
15
20
25
30
35
40
45
TAGE
%100
80
60
40
20
Penicillin
0,01%ig
5
10
15
20
25
30
35
40
45
TAGE

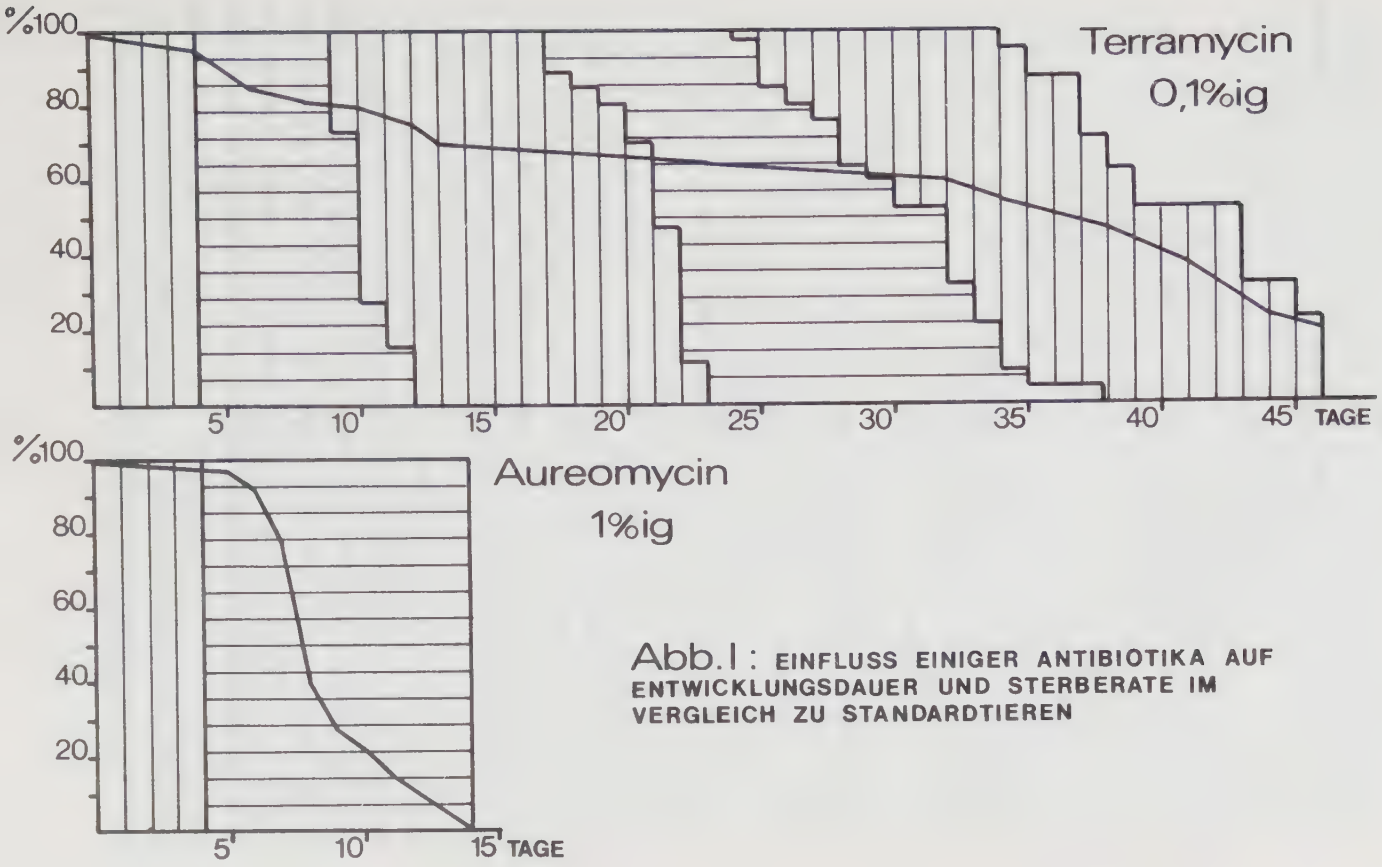


Abb.1: EINFLUSS EINIGER ANTIBIOTIKA AUF ENTWICKLUNGSDAUER UND STERBERATE IM VERGLEICH ZU STANDARDTIEREN

ne Eiablage beobachtet werden konnte.

Bei folgenden Substanzen war die Eiproduktion bei o,1% iger Verabreichung stark beeinträchtigt und auf ein Gelege mit teilweise erniedrigter Eizahl reduziert: bei Aureomycin,Sulfamerazin, Vibramycin,Penicillin,Bactrim und Irgafen.Bei Terramycin-Verabreichung kam es nicht zu einer Eiablage(Tab.2).

Bei Tieren mit 1% igem Antibiotika-Futter konnte nur mit Sulfadimidin eine einzige Eiablage mit stark reduzierter Eizahl beobachtet werden.

Die geringsten Auswirkungen auf das Tier haben in jeder Beziehung Sulfadimidin,Sulfamerazin und Garamycin,während Aureomycin und Terramycin den schädlichsten Einfluss der untersuchten antibakteriellen Substanzen aufweisen.

Weitere Ausfallserscheinungen: Schon bei o,1% iger Verabreichung konnten vorallem bei Terramycin,Aureomycin und Bactrim verkrüppelte oder zu kurze Flügel bei Adulttieren beobachtet werden, ebenso bei allen untersuchten Tieren mehr oder weniger stark geblähte Därme,die prall mit Nahrungsbrei gefüllt waren.

5.1.3. Antibakterielle Wirkung auf die Darmflora

Es wurden Sensibilitätsteste verschiedener Antibiotika und Sulfonamide in vitro gemacht,und es stellte sich heraus,dass eine starke Empfindlichkeit der Gram pos. Keime gegen Garamycin und Tetracyclin besteht,während Penicillin und Sulfonamide unwirksam sind.Bei den Gram neg. Keimen findet man eine allgemeine Resistenz gegen alle gebräuchlichen Antibiotika und Sulfonamide,ausser gegen Garamycin.Die Voraussetzungen für eine Eliminierung aller Keime waren somit schlecht,und es stellte sich auch bald heraus,dass eine vollständige Sterilität des Darmes nicht erreicht werden konnte.Der jeweilige Bestand der Darmflora wurde durch Ausstrichpräparate geprüft,wobei sich nur geringfügige Veränderungen gegenüber Kontrollen zeigten,auch nach längerer Präparat-Verabreichung.Sie betrafen vorallem die Gram pos. Keime,deren verminderte Teilungsaktivität in einem Verlust der Fähigkeit zur Kettenbildung und in der Gramlabilität zum Ausdruck kommt.Solche Veränderungen findet man vorallem bei Terramycin,Aureomycin und Bactrim,während Sulfamerazin,Sulfaguanidin und Irgafen in dieser Be-

ziehung keinen signifikanten Einfluss zeigen.Bei den Gram neg. Keimen kann keine Aussage gemacht werden über eine verringerte Aktivität.Im allgemeinen nimmt die Bakterienpopulation ab,vorallem bei 1% igen Präparat-Verfütterungen.Die Resultate stimmen mit den in vitro Prüfungen der Antibiotika überein.

In mehreren Ausstrichen können nach einer gewissen Zeit Flagellaten gefunden werden,die auf eine Veränderung der Bakterienpopulation hindeuten,da sie beim Normalbestand nicht auftreten.

5.1.4. Kommentar zu den Resultaten

Es stellt sich nun die Frage,ob die Mangelerscheinungen am Tier auf eine direkte toxische Wirkung der antibakteriellen Stoffe oder auf die Veränderung der Darmflora zurückzuführen sind.Möglich wäre auch ein schädlicher Einfluss der Flagellaten,insofern, dass diese Nährstoffe für sich beanspruchen,die damit für das Tier verloren gehen.

Da die untersuchten Stoffe die Bakterienpopulation nur partiell ändern,und vorallem auf die Enterokokken nur einen wachstumshemmenden Einfluss haben,sind die Ausfallserscheinungen am Tier wohl eher als toxische Symptome zu bewerten,insbesondere bei 1% iger Verabreichung.Andere Autoren(Selmair 1962,Frank 1956, Brooks 1955,Ehrhardt und Schmutterer 1966) fanden gleiche Symptome bei keimfreien Tieren und führten sie auf den Verlust der Symbionten zurück,wobei die Frage nach der Toxizität der verwendeten Antibiotika nie ausführlich behandelt wird.Erscheinungen wie verkrüppelte Flügel und Darmblähungen werden als Avitaminosesymptome gedeutet,wobei angenommen wird,dass diese durch den Verlust der vitaminliefernden Symbionten zustande kommen.In meinem Fall würde sich ein solcher Vitaminmangel nur erklären lassen durch eine zwar nicht genau erfassbare Umstellung der Darmflora,die,wie bekannt ist ,eine Aenderung der Darmschleimhaut bewirken kann und damit schwere Resorptionsstörungen verursacht.Davon werden verschiedene Vitamine betroffen(aus Kettel Diss.1966).Eine andere Theorie erwähnt ebenfalls eine Veränderung der Darmflora unter Antibiotika-Einfluss und postuliert das Aufkommen von Bakterien, wie z.B. Coli,die B-Vitamine aus der Umgebung aufnehmen und speichern können.Damit wird die Resorption von Nahrungsvitaminen ver-

mindert.Schröder(196o) dagegen erwähnt eine direkte Antivitaminwirkung gewisser Antibiotika.Ein echter Antagonismus scheint zwischen Aureomycin und Riboflavin zu bestehen.Als weitere Komplikation finden wir eine direkte toxische Wirkung von Breitspektrumantibiotika,die zumindest beim Menschen zu einer Enterocolitis führen kann.Das Angebot an möglichen Einflüssen der Antibiotika auf das Tier ist somit sehr gross,besonders,wenn man auch noch die toxischen Wirkungen,vorallem von hohen Dosen,im Organismus ausserhalb des Darmes berücksichtigt.Es muss hier auch gesagt werden,dass eine Substitution des Futters mit B-Vitaminen keinen therapeutischen Effekt auf die Ausfallserscheinungen von Dysdercus ausübt.Es ist deshalb sicher Vorsicht geboten bei der Deutung der Mangelerscheinungen bei antibiotisch behandelten Tieren.

Für Insekten im speziellen muss hier auch noch die Arbeit von Singh(197o) erwähnt werden,der für verschiedene antibakterielle Stoffe,die er keimfreien Tieren verfütterte,eine 'safe' und eine 'toxic' level bestimmen konnte.Er stellte fest,dass jede untersuchte Substanz an sich schädigende Wirkungen auf das Insekt ausübt,je nach seiner Konzentration.Dabei ist zu beachten,dass Aureomycin bei o,15% iger und Terramycin bei o,2% iger,Bacitracin bei 5% iger und Penicillin bei 3% iger Verabreichung absolut toxisch sind für das Tier.Ein solcher Befund würde bei meinen Resultaten vorallem die starken Schädigungen bei der Verabreichung von Terramycin und Aureomycin,auch schon in niederen Dosen erklären.Es ist somit sicher angebracht,dass vor jeder Verwendung von Antibiotika Untersuchungen über entsprechende 'safe' levels durchgeführt werden sollten,da sonst eine Aussage über den Ursprung der Ausfallserscheinungen nicht statthaft ist.

Es ist hier abschliessend zu sagen,dass bei Dysdercus 1. mit einer Antimicrobia-Verabreichung die Bindung zwischen Darmflora und Wirt nicht gelöst,sondern höchstens verändert werden kann und,dass 2. keine Aussagen gemacht werden können über die Bedeutung der Bakterien im Darm für das Insekt.Es muss somit eine neue Methode gefunden werden,um die Bakterien aus dem Wirtsorganismus zu eliminieren.

5.2. Versuche zur Sterilisation des Normalfutters

Anfänglich wurde versucht eine halbsynthetische Diät herzustellen,die durch Autoklavieren oder Bakterienfilter sterilisiert werden konnte.Die keimfreien Tiere sollten durch Eisterilisation erhalten werden.Da die von Herzog(1964) für adulte Tiere ausgearbeitete Diät auf Vollei-Basis für Larven ungenügend war,versuchte ich sie durch verschiedene Nährstoffe,wie Proteine,Vitamine und Mineralstoffe zu ergänzen.Es wurde dabei nur das Eiklar als biologische Grundsubstanz beibehalten,da eine möglichst definierte Diät erwünscht war.Weder mit dem Vollei und Zusätze,noch mit dem Eiklar und Zusätze konnte jedoch eine vollwertige Nahrung hergestellt werden.

Somit blieb nur noch die Möglichkeit der Sterilisation des Normalfutters,also der Baumwollsamen.

Es ist bekannt,dass die meisten Methoden zur Sterilisierung biologischen Materials ungenügend sind,oder aber eine qualitätserniedrigende Wirkung haben.Die Voraussetzungen waren somit nicht sehr gut,und die Untersuchungen nahmen deshalb lange Zeit in Anspruch.

Es wurden folgende Methoden versucht:

a. Zerkleinertes Futter wurde dreimal mit Trockeneis(-7o bis-8o^{o}C) eingefroren und rasch wieder aufgetaut.Dadurch sollten die Bakterienzellen zerplatzen.Die Wirksamkeit dieser Methode ist aber beschränkt,und es konnte keine vollständige Sterilität erzielt werden.

b. Zerkleinertes Futter wurde mit Chloroform versetzt und eine halbe Stunde stehengelassen.Danach konnte aber keine vollständige Entfernung des Chloroforms durch Vakuum erreicht werden,und die Proben waren ebenfalls nicht steril.

c. Ein weiterer,kombinierter Versuch wurde mit 2o min. Ultraschalleinwirkung unternommen und anschliessendem Einfrieren und Auftauen.Auch damit erreichte man keine absolute Sterilität,wobei vorallem Gram pos. Keime gegen solche Prozesse resistent zu sein scheinen.

d. Auch eine 5 std. UV-Bestrahlung hatte nicht die gewünschte sterilisierende Wirkung.

e. Ganze Samen nach 100°C-Erhitzung während einer Stunde enthielten immer noch Gram pos. Keime.

f. Ebenfalls nicht steril waren Samen,die eine Stunde unter UV-Bestrahlung und anschliessend bei 95°C während 14 Stunden gehalten wurden.

g. Nur eine 1 std. Erhitzung auf 160°C im Autoclav erzielte eine vollständige Sterilität.Es stellte sich jedoch bald heraus,dass diese Nahrung nicht mehr vollwertig war für das Tier.Durch Zusätze wurde versucht,eine Qualitätsverbesserung zu erreichen.Vitaminlösungen aus Becocym,Folsäure,p-Aminobenzoesäure,Cholin und Inosit wurden mit Bakterienfilter sterilisiert und unter das sterile Futter gemischt.In weiteren Versuchen wurden den mangelhaften Samen auch Bierhefe,Normalfutterextrakt,Baumwollsamenöl,Cholesterin,Bouillon,Fruktose,Raffinose,Stärke und sogar Juvenilhormon in verschiedenen Zusammensetzungen beigegeben.Das Resultat war aber in keinem Fall befriedigend.Die Tiere machten immer nur bis und mit 3. Häutung durch und blieben dann in ihrer Entwicklung stehen.Die Sterblichkeit war bei allen Versuchen,mit oder ohne Zusätze,nicht beeinträchtigt.Eine gewisse Diätverbesserung konnte nur mit einem Casein- und Carnitin- Zusatz erreicht werden.Die Tiere häuteten sich damit ein viertes Mal,aber auch das stark verspätet.Es wird hier offensichtlich,wie stark sich dieses Insekt auf seine Nahrung spezialisiert hat.

Somit mussten auch alle diese Methoden aufgegeben werden,um ein befriedigendes Futter für eine keimfreie Aufzucht zu erhalten.

6. AUFZUCHT KEIMFREIER TIERE

6.1. Sterilisation der Eier

Als nächstes Problem wurde vorerst die Eisterilisation angegangen.Es stellte sich bald heraus,dass eine dreiminütige Sterilisation der Eier mit 5% igem Chloramin in 7o% igem Alkohol,wie sie Foeckler(1961) angibt,den Anforderungen nicht entsprach.Auch weitere Versuche mit konzentrierteren Lösungen(1o% ig) und längeren Einwirkungszeiten(bis 15 Min.),sowie kombinierte Methoden mit Hydromerfen(Zyma,konz.) und Chloramin(1o% ig) und Hydromerfen und Gevisol(15% ig) erzielten keine Sterilität der Eier.Vorallem die Gram pos. Keime erwiesen sich als resistent.Die Schlüpfrate nach diesen Behandlungen war gut,bis auf die Gevisol-Methode.Dieses Agens hat eine ölige Konsistenz und hinterlässt einen Film auf den Eiern,der das Schlüpfen verunmöglicht.

Es wurden nun eine ganze Reihe von Sterilisationsvorgängen kombiniert.Während anfänglich eine UV-Bestrahlung in die Behandlung eingeschoben wurde,musste diese wieder weggelassen werden,da sie die Schlüpfrate negativ beeinflusste.

Die Eier wurden ein Tag vor dem Schlüpfen der Jungtiere mit einer Insektenpincette aus der Erde herausgelesen und in ein steriles Reagensglas gebracht,das mit einem sterilen Gummizapfen verschlossen werden konnte.Es war wichtig,dass die Eier in den betreffenden Desinfektionslösungen immer gut durchgeschüttelt wurden.Nach jedem Schritt wurde der Gummizapfen gewechselt.

Die Sterilisierungsmethode setzte sich aus den folgenden Prozessen zusammen:

1. Die Eier wurden dreimal mit 5% igem Desogen gespült während 5 Minuten.

2. Dreimaliges Spülen mit sterilem H_2O und anschliessend 7o% igem Alkohol.

3. Desinfizieren mit 15% igem Chloramin in 7o% igem Alkohol während 1o Minuten,wobei die Lösung einmal gewechselt wurde.Wenn vor dieser Prozedur das Desogen nicht vollständig entfernt ist,bildet sich ein weisser Niederschlag,der sich auf den Eiern festsetzt und das Schlüpfen verhindert.

4. Spülen mit sterilem dest. H_2O und verdünnter Streptomycin-Penicillin-Lösung(1:1o verdünnt,siehe 5.).

5. Einwirkung einer konzentrierten,sterilen Streptomycin-Penicillin-Lösung(1 Mill.IE Penicillin + 1g Streptomycin in 1o ml H_2O dest. steril) während 2o Minuten,wobei das Reagens einmal gewechselt wurde.

6. Spülen mit verdünnter Streptomycin-Penicillin-Lösung und anschliessend viermal mit H_2O dest.

Auf diese Art behandelte Eier waren jedes Mal absolut steril, was jeweils durch Sterilitätsproben in Bouillon nachgeprüft wurde.Die Tiere schlüpften am folgenden Tag zu nahezu 1oo%.

6.2. Sterilisation des Futters

Nach den misslungenen Versuchen der Futtersterilisation,wurde nach weiteren Methoden gesucht.Auf dem Gebiet der Entomologie ist nichts bekannt über solche Sterilisationsverfahren.Meist werden endogene Symbiosen untersucht mit hochspezialisierten Keimen,wo eine Sterilität des Futters nicht notwendig ist,oder es werden synthetische Diäten verwendet,die durch Autoclavieren sterilisiert werden können.

Ein anderer Bereich,wo steriles Futter notwendig ist,finden wir bei der Aufzucht von SPF und germ-free Labortieren.Auch für Lebensmittel werden verschiedene Konservierungsprozesse angewendet.Unter den benutzten Methoden werden Dampfsterilisation bei verschiedenen Temperaturen,Trockenlufterhitzung,γ-Strahlen,β-Strahlen und Aethylenoxyd-Begasung(Aeto) erwähnt.Erstere Methode fiel für meine Untersuchungen weg,wie aus den Resultaten des vorhergehenden Kapitels ersichtlich ist,und die folgenden Strahlenmethoden waren aus technischen Gründen nicht durchführbar.Somit blieb nur noch die Möglichkeit der Aeto-Begasung.Aethylenoxyd hat eine stark bakterizide Wirkung,ist aber äusserst giftig und explosiv.Die Sterilisation erfolgt unter Druck und wird deshalb meist nur in grosstechnischen Anlagen durchgeführt.Es war aus den obenerwähnten Gründen nicht möglich,die Begasung im Labor zu machen,und ich bin der Firma Ciba-Geigy sehr zu Dank verpflichtet, dass sie mir die jeweiligen Futterproben sterilisierte.

Zur Verhinderung einer Reinfektion wird das Futter in Polyaethylenbeutel verpackt,die zugeschweisst werden.Die Behandlung mit Aeto findet unter folgenden Bedingungen statt: Temperatur 57°C, Druck 5,9 atü,Zeit 6o Minuten.Die Futterproben waren nach dieser Behandlung vollkommen steril.Ueber die Aeto-Sterilisation sind im Zusammenhang mit Diäten für SPF-Tiere mehrere Arbeiten publiziert worden.Es bestehen einige Kontroversen über den Anwendungsbereich dieser Methode,vorallem im Hinblick auf toxische Rückstände und die Zerstörung einiger Nährstoffe im sterilisierten Futter.Während Porter und Bleby(1966) eine schädigende Wirkung von Aethylenoxyd sterilisiertem Futter auf die Reproduktion eines Inzucht Mäusestammes feststellten und diese auf toxische Rückstände im Futter zurückführten,konnten Lucky et al(1963,in Drepper 1967) Ratten und Mäuse über Generationen ohne Auswirkungen züchten.Ebenso verneint Bär und Griepentrog(1969) einen Effekt auf Ratten nach fünfwöchiger Verfütterung.Einen Einfluss auf den Vitamingehalt stellten verschiedene Autoren fest.Die Begasung bewirkt eine Nikotinsäure-,Aneurin- und Riboflavin-Erniedrigung im Futter(Porter und Bleby 1966,Drepper 1967),während eine Verringerung des Proteingehaltes nicht bestätigt werden konnte.Einige Unterschiede bestehen auch in den Angaben über die Belüftungszeit nach der Sterilisation.Während Manchon und Buquet(197o) nach drei Tagen keine nenenswerte Aeto-Konzentration im Futter nachweisen konnten,gibt Soós(1966) erst nach drei Wochen eine Aeto-Freiheit an.Die Belüftungszeit scheint sehr stark vom behandelten Material abzuhängen.

Nach einer anfänglichen Aufbewahrung im Kühlschrank,die aber eine verstärkte Mortalität bei den Tieren bewirkte,liess ich die Packungen bei Zimmertemperatur während acht Tagen liegen,bevor das Futter verwendet wurde.

Es sollte sich nun zeigen,inwiefern sich die obenerwähnten Nachteile der Aeto-Sterilisation auf Insekten auswirken würden, vorallem weil diese Substanz auch als Insektizid bekannt ist.

6.3. Haltung der Tiere

Das sterile Futter wurde nach dem Belüften mit einem ausgeglühten Spatel aus dem Plastikbeutel in sterile Reagensgläser überführt.Es war damit möglich,Futterportionen für jeden Tag her-

zustellen,die dann jeweils mit einer gewissen Menge sterilem Wasser angerührt wurden.Diesen Futterbrei gab man in Alu-Folienschälchen,die in einer Petrischale sterilisiert wurden.

Nachdem die Eier sterilisiert waren,wurden sie mit einer ausgeglühten Oese in Gewebekulturflaschen(Falcon-Plastic 75 cm^2) oder auch in Glasgewebekulturflaschen mit Gummizapfen verbracht.Da die frischgeschlüpften Tiere besonders feuchtigkeitsabhängig sind und noch nicht an das Futter gehen,wurden die Eier auf sterile,feuchte Gaze gelegt.Dadurch konnten die ganz jungen Larven,die sich kaum von ihrem Schlupfort wegbewegen,direkt Wasser aufnehmen.In den ersten vier Tagen,bis nach der 1.Häutung,nehmen die Tiere keine Nahrung zu sich.Sie ernähren sich noch von den Dotterresten im Darm.Die erste Fütterung erfolgte somit erst nach fünf Tagen,wobei auch die Gaze entfernt wurde.Von diesem Zeitpunkt an wurde das Futter täglich gewechselt.Mit Hilfe einer sterilen Pincette und jeweiligem Abflammen der Flaschenöffnung und oder Wechseln des Gummizapfens,wurde das alte Futter entfernt und das neue Alu-Schälchen hineingebracht.Auf eine zusätzliche Wasserquelle wurde verzichtet,da die Tiere sehr gut auskamen mit dem angefeuchteten Futter,das auch gleichzeitig die notwendige Luftfeuchtigkeit im Gefäss garantierte.Die Flaschen wurden bei jungen Tieren jeden zweiten Tag und bei älteren Tieren täglich gewechselt,da die sehr dünnflüssigen Exkremente die Tiere sonst behinderten.Der Ausfall an Individuen,die wegen der sehr glatten Oberfläche oftmals auf den Rücken fielen und dabei an den Exkrementen kleben blieben,war ziemlich hoch,vorallem bei jungen und frischgehäuteten Tieren.

Die Flaschen wurden in einem Holz-Glas-Kasten aufbewahrt,der öfters mit Desogen und UV desinfiziert wurde.Anfänglich brannte die UV-Lampe dauernd während ca 8 Stunden,um eine gewisse Sterilität des Kastens zu erreichen.Es stellte sich aber heraus,dass Flügelverstümmelungen bei Adulttieren auf dieser zu langen Bestrahlung beruhten.Nachdem die UV-Lampe nur noch 2-3 Stunden täglich brannte,konnten keine solche Aberrationen mehr festgestellt werden.

Erst nach etwa drei Wochen wurde jeweils die erste Sterilitätsprobe in Bouillon mit drei Tieren der einzelnen Versuche ge-

macht,um den Tierbestand nicht zu stark zu dezimieren.Es wurden nur diejenigen Gruppen weitergeführt,bei denen alle Proben steril waren.Bei nicht sterilen Proben wurde eine bakteriologische Untersuchung nach 3.3. gemacht,die meistens eine Infektion mit einem einzelnen Keim zeigte,was auf eine Verschmutzung durch die Luft hinweist.Das Risiko einer Infektion war bei den zahlreichen auszuführenden Prozessen ziemlich gross.

Eine weitere Sterilitätsprobe wurde bei Adulttieren durchgeführt.Es war nicht möglich,Tiere länger als 12 Tage nach der Adulthäutung keimfrei zu erhalten(im ganzen ca 4o Tage).

6.4. Einfluss des sterilen Futters auf das normal infizierte Tier

Um den Einfluss des sterilisierten Futters auf das Insekt zu prüfen,wurde es frischgeschlüpften,normalen,d.h. mit Darmbakterien versehenen Tieren,unter normalen Bedingungen verabreicht.Die Tiere entwickelten sich sehr gleichmässig,und die Fläche der Normalentwicklungskurve betrug 274,lag also an der untersten Grenze der Normalkurvenfläche von Tieren mit infiziertem Futter(Tab.3 und Abb.I).Ebenso ist die Sterblichkeit äusserst gering während des Larvallebens und zeigt erst vom 39.Tag an einen starken Anstieg.Bei normal gefütterten Tieren sinkt die Kurve eher stetig. Die Lebensdauer ist bei beiden Gruppen dieselbe.Während Friend (1959) einen entwicklungsbegünstigenden Einfluss von Bakterien in einer chemisch definierten Diät beobachtet,ist hier eher das Gegenteil zu finden.Es ist aber durchaus möglich,dass durch die hohe Feuchtigkeit und Temperatur im Zuchtgefäss das bakterielle und mykotische Wachstum so stark angeregt wird,dass trotz täglicher Futtererneuerung,Qualitätsverminderungen der Nahrung oder direkte toxische Wirkungen durch Ausscheidungsprodukte erfolgen,was einen gewissen Einfluss auf die Entwicklung der Tiere haben kann.

Auf die Darmflora hat das sterilisierte Futter keinen Einfluss, was auch wieder daraufhinweist,dass die Fauna bereits beim Schlüpfen durch die Keime der Eioberfläche bestimmt wird.

Die Eizahl der normalgefütterten Weibchen beträgt bei den ersten zwei Gelegen 6o-loo,während das dritte Gelege geringere Zahlen aufweist.Mit sterilem Futter konnte eine verminderte Eiproduktion festgestellt werden.Obwohl die Tiere auch drei Gelege

	Fläche der Häutungs/Zeit-Kurve	5o% Sterblichkeit Tag	Eigelege 1.	2.	3.
normal infizierte Tiere mit Standardfutter	275-3o7	34-38	6o-1oo	6o-1oo	4o-6o
normal infizierte Tiere mit sterilem Standardfutter	274	42	3o-5o	25	25
keimfreie Tiere mit sterilem Standardfutter	271-3o8	18-33	3o-5o	4o-5o	-

TABELLE 3 : Einfluss von sterilem Futter auf normal infizierte und auf keimfreie Tiere.

zeigten,war die Eizahl kleiner.Es konntne 33 resp.5o im ersten Gelege,25 resp.24 im 2. Gelege und 25 Eier im 3. Gelege beobachtet werden(Tab.3).Hier drückt sich möglicherweise eine Beeinträchtigung des Futters durch die Aethylenoxyd-Sterilisation aus.Die Resultate mit dieser Methode sind jedoch trotzdem als gut zu betrachten,da keine Insektizidwirkung festgestellt werden kann,und da die Larvalentwicklung vollkommen normal verläuft,die,wie aus den Diätversuchen ersichtlich ist,besonders abhängig ist von einem vollwertigen Futter.

6.5. Vergleich zwischen normal infizierten und keimfreien Tieren

Als weiterer Schritt wurde das keimfreie Futter nun an steril geschlüpfte Tiere verabreicht in der vorher beschriebenen Weise. Auch diese keimfreien Tiere entwickelten sich normal auf dem sterilisierten Futter,wie aus Tab.3 ersichtlich ist.Damit wird offensichtlich,dass die Darmflora keine nahrungsergänzende Bedeutung hat für Tiere unter sterilen Bedingungen.Solange Dysdercus die optimale Standardnahrung erhält und nicht durch veränderte Umgebungsfaktoren beeinflusst wird,ist es imstande,seine Nahrungsbedürfnisse allein aus dem Futter zu decken.

Die etwas erhöhte Sterblichkeit während der Larvalentwicklung kann ganz auf die ungünstigere,aber erforderliche Haltung in Gewebekulturflaschen zurückgeführt werden.Es zeigte sich auch,dass bei geringerer Anzahl an Versuchstieren in den Flaschen,also bei geringerer Verschmutzung,die Mortalität wieder verringert werden konnte.Eine noch grössere Mortalität zeigte sich bei Normaltieren, die in Gewebekulturflaschen als Kontrollgruppen parallel liefen. In diesen Gefässen war die Verschmutzung noch stärker,und die Tiere blieben vorallem nach den Häutungen oft an der Unterlage kleben.

Während der Zeit,in der die Sterilität der Adulttiere gesichert war,konnten meist nur ein,selten zwei Gelege beobachtet werden(Tab.3).Die Ablage erfolgte zur gewohnten Zeit,und die Eizahl kann mit derjenigen der nicht keimfreien,aber mit sterilem Futter aufgezogenen Tiere verglichen werden.Es wurden folgende Eizahlen beobachtet:

1. Gelege	2. Gelege
33 Eier	4o Eier
4o "	5o "
5o "	4o "
39 "	52 "

Bei keimfreien Tieren zeigt sich als auffallender Unterschied zu normalen,dass der 3.Ventrikel vergrössert ist.Zudem ist die Darmwand viel zarter und platzt beim Anfassen mit der Pincette leicht auf,wobei der dünnflüssigere,dunklere Darminhalt ausfliesst. In histologischen Präparaten,die mit Hämalaun-Eosin,Alicianblau-Kernechtrot und PAS gefärbt wurden,konnten keine Unterschiede in der Darmepithelmorphologie festgestellt werden.Aehnliche Beobachtungen bei keimfreien Ratten und Mäusen,wo die Blinddärme vergrössert werden durch sterile Nahrung,wurden von Drepper(1967) gemacht.Eine Erklärung dieses Phänomens ist nicht bekannt,aber es weist auf eine gewisse Wechselbeziehung zwischen Darmflora und Insekt hin.

6.6. Reinfektionsversuche

Um den Einfluss eines einzelnen Keimes auf das Tier zu untersuchen,wurden Reinkulturen von Darmbakterien unter das sterile Futter gemischt,und dem keimfreien Insekt am Ende des 4. Larvenstadiums verfüttert.Das beimpfte Futter wurde in Bouillonkulturen auf Reinheit und Ueberlebensfähigkeit der Keime geprüft.

Nach achttägiger Verfütterung waren die Bakterien im Insektendarm nachweisbar,sowie auch nach der Absetzung des infizierten Futters.Weder bei Pseudomonas,noch bei Klebsiella,E.coli und Enterokokken konnte eine Beeinflussung der Entwicklungszeit,der Mortalität oder der Eizahl beobachtet werden.Das Insekt scheint die Keime als Kommensalen zu tolerieren,ohne von ihnen beeinflusst zu werden.

7. PROTEASENBESTIMMUNGEN

7.1. Methode

Für die Proteasenbestimmungen wurde eine modifizierte Methode nach Rinderknecht et al(1968) mit Hide Powder Azure(Calbiochem Los Angeles) als Substrat angewendet.Bei diesem Substrat sind die Hydroxylgruppen des Proteins durch Aetherbindung mit dem Farbstoff (Remazolbrillant-Blau) verknüpft.Das Enzym wirkt unter Standardbedingungen auf das unlösliche Kollagen ein.Bestimmt wird die aufgelöste Kollagenmenge.

Für die Standardbestimmungen wurde mit Pools von 2-5 Weibchen resp. Männchen gearbeitet.Nach einer leichten Aethernarkose des Tieres wurde der Darm herauspräpariert,und der 2. und 3.Ventrikel gesondert in Achatmörsern mit wenig Quarzsand und Phosphatpuffer(pH 6,3) zerrieben.Dieser pH entspricht ungefähr demjenigen des Insektendarmes.Herzog(1967) gibt für den 3.Ventrikel einen pH von 6,4,und für den 2.Ventrikel einen pH von 6,8 -7 an. Die Proteasemessungen erwiesen sich aber auch im 2.Ventrikel bei pH 6,3 als optimal.Nach dem Zerreiben wurde der Rest von 2 ml Puffer hinzugegeben,und das Ganze nochmals gründlich vermischt. Diese Suspension wurde auf Eis aufbewahrt.o,5 ml der Lösung wurden mit 25 mg Hide Powder Azure während 45 Min. bei $38^{o}C$ im Wasserbad,ohne zu schütteln,inkubiert.Nach erfolgter enzymatischer Einwirkung gab man 4,5 ml Puffer zu und filtrierte rasch vom ungelösten Substrat ab(Filterpapier Whatman GF/C).Eine Blindlösung mit o,5 ml Puffer,anstelle der Darmsuspension,liess man mitlaufen. Die Farbintensität der resultierenden klaren,blauen Lösung wurde in einem Beckman Spektrophotometer Model DB-G bei einer Wellenlänge λ=595 nm gemessen.In der Referenzküvette wurde dest.H_2O verwendet.Den Blindwert subtrahierte man jeweils von den Enzymmessungen ab.Die auftretende Eigenfarbe der Darmsuspension wurde vernachlässigt,da die Kurven,bei denen die gesondert gemessene Eigenfarbe von den Werten abgezogen wurde,denjenigen ohne Subtraktion parallel liefen.

Für die Proteaseaktivität wurde eine willkürliche Einheit gewählt: Proteaseaktivität=Absorption $*10^{2}$(Thomsen und Møller 1963).

Die erhaltenen Werte wurden jeweils auf ein Tier umgerechnet.

7.2. Proteasenaktivität bei Standardtieren

Ford(1962) erwähnt,dass Dysdercus fasciatus keine Proteinase produziert.Leider gibt er nicht an,mit welcher Methode er gearbeitet hat.Herzog(1967) fand aber mit Darmhomogenaten in 1% iger Gelatinelösung und anschliessender Chromatographie der freiwerdenden Aminosäuren eine Proteasenaktivität im 2. und 3.Ventrikel. Er schreibt diese den im 2. und 3.Ventrikel vorhandenen Darmsymbionten zu.

Durch die vorliegenden Untersuchungen mit einer sehr empfindlichen Methode,ist eine Proteasenaktivität sicher nachzuweisen, und wie später gezeigt werden soll,ist sie auch unabhängig von den Darmbakterien.Dysdercus fasciatus besitzt ein eigenes Proteasensystem,das bei pH 6,3 ein optimales Wirkungsspektrum besitzt. Mit diesem leicht sauren pH weicht Dysdercus eher von der Regel ab,da Proteasen bei Insekten im neutralen oder alkalischen Bereich ihre optimale Aktivität besitzen(House 1965) und der Darminhalt bei phytophagen Insekten im allgemeinen alkalischer ist, als bei carnivoren(Day und Waterhouse 1953).

Insektenproteasen werden als trypsinartige Stoffe beschrieben, die aber pH- und Spezifitätsunterschiede zum Säugertrypsin zeigen(Ganti und Shanmugasundaram 1963,Gooding 1966,Pfleiderer und Zwilling 1965).

Khan und Ford(1962) erwähnen in ihrer Arbeit über verschiedene Darmenzyme bei Dysdercus fasciatus,dass Füttern scheinbar die Enzymproduktion stimuliert.Da der Darm nur schwach innerviert scheint,ist es möglich,dass dieser Stimulus hormonell übermittelt wird.Andere Autoren schlagen eine hormonelle Kontrolle auch für die Proteasesekretion im Verdauungstrakt von verschiedenen Insekten vor.Thomsen und Møller(1959,1963),Dadd(1961) und Rao und Fisk(1965) haben gezeigt,dass Veränderungen in der Darmproteasenaktivität eine Korrelation mit der Ovarentwicklung aufweisen und deshalb vermutlich auch mit der Neurosekretion.

Andere Insekten zeigen dagegen keine hormonelle Steuerung der Proteasenaktivität(Dadd 1956,Engelmann 1966,Gordon 1968,1970). Man vermutet bei diesen Insekten eine Kontrolle durch nervöse und /oder durch direkte chemische Stimulierung.

Die Proteaseaktivität bei Dysdercus fasciatus wurde bei Männchen und Weibchen getrennt am 1.,2.,3.,5. und 7. Tag nach der Adulthäutung untersucht.Für das Weibchen stellt diese Zeit einen Eireifungszyklus dar.Nach dem 7. Tag erfolgt die erste Eiablage. Um einen Zusammenhang der Proteasesekretion mit der Eireifung festzustellen,wurden beim Weibchen auch am 1.,2. und 3. Tag nach der ersten Eiablage weitere Proteasebestimmungen durchgeführt.

Beim Männchen unterscheiden sich die Proteasenaktivitäten im 2. und 3.Ventrikel wenig(Tab.4).Die Werte laufen nahezu parallel und zeigen am 2. Tag ein Maximum,um dann kontinuierlich abzufallen bis am 7. Tag.Ueber die Sekretion von Hormonen im männlichen Adulttier ist nur wenig bekannt.Dadd(1956,1961) untersuchte die Proteaseaktivität bei Männchen und Weibchen von Tenebrio molitor und fand einen leicht erhöhten Enzymgehalt bei Weibchen.Die Aehnlichkeit des Anstiegs und Abfalls an den untersuchten Tagen schien ihm jedoch genügend gross,um die Resultate zusammenzufassen. Gleichzeitig schlägt er eine hormonelle Steuerung der Proteaseaktivität vor,die deshalb auch bei Männchen in Erscheinung treten muss.

Sláma(1964,1965) findet einen geringen Einfluss der Hormone auf den Gesamtstoffwechsel der Pyrrhocoris-Männchen,obwohl eine gleiche Hormonaktivität postuliert wird.Die Unterschiede in der chemischen Körperzusammensetzung von Weibchen und Männchen werden damit begründet,dass die Spermatogenese viel geringere Anforderungen an den Nährstoffverbrauch stellt als die Oogenese.

Da meine Arbeit diese Zusammenhänge nicht im speziellen untersuchte,kann nur auf eine eventuelle Uebereinstimmung mit den Arbeiten der erwähnten Autoren hingewiesen werden.

Bei den Weibchen ergaben sich einige weitere Hinweise auf eine Korrelation zwischen Eireifungszyklus und Proteasenaktivität im 3.Ventrikel(Tab.5).Bei normal kopulierenden Weibchen steigt der Proteasegehalt am 2. Tag auf ein Maximum an und fällt dann bis zum 7. Tag kurz vor der Eiablage wieder ab.Hier könnte eine Uebereinstimmung mit Rao und Fisk(1965) vorliegen: '...with normally mated females our data strengthen the emerging complex pattern of m.n.c. and corpora allata secretions,elevated haemo-

lymph protein levels,and oocyte development.When oocyte development is complete and gestation begins there is a cessation of m.n.c. and corpora allata secretions and a lowering of trypsin activity and haemolymph protein levels.'

Eine weitere Unterstützung der Hypothese ist der nochmalige Enzymanstieg nach der 1. Eiablage,der nur bei Weibchen eintritt, deren Körpergrösse,durch die Vorbereitung einer weiteren Eiablage, stark zunimmt.Ebenso ergab sich für Virgines eine viel grössere Enzymaktivität als für kopulierende Weibchen am 7. Tag,was ebenfalls mit Rao und Fisk(1965) übereinstimmt.

Die Enzymaktivität des 2.Ventrikels zeigt beim Weibchen ein ganz anderes Bild als beim Männchen(Tab.5).Das abwechselnde, sprunghafte Zu- und Abnehmen der Kurve weist eher auf einen direkten mechanischen oder chemischen Einfluss durch die Futteraufnahme hin.Zur Abklärung dieser Zusammenhänge müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

7.3. Vergleich der Proteasenaktivität bei Standard- und keimfrei aufgezogenen Tieren.

Ein weiteres Ziel dieser Untersuchungen stellte die Abklärung einer eventuell wirksamen Bakterienprotease dar,als Ausdruck einer einfachen symbiontischen Leistung.Zu diesem Zweck wurden keimfrei aufgezogene Tiere auf ihren Mitteldarm-Proteasegehalt hin geprüft.

Da keimfreie Tiere nur in beschränkter Zahl aufgezogen werden konnten,mussten die Bestimmungen mit einem Tier durchgeführt werden.Als Vergleichswert wurden deshalb ebenfalls Messungen mit einem Standardtier verwendet.Dabei stellte sich heraus,dass diese Werte meist etwas tiefer lagen,als diejenigen,die mit Tier-Pools erhalten wurden.Signifikante Unterschiede zwischen Standard-Pools und Standard-1 Tier stellten sich bei Männchen 2. Tag,3.Ventrikel und bei Weibchen 1. Tag,3.Ventrikel($2\alpha < o,o1$) heraus.Diese Unterschiede hängen vermutlich mit der geringeren Empfindlichkeit der Methode in unteren Messbereichen und mit der grösseren individuellen Schwankung bei der Verwendung von einem Tier zusammen.

Wie aus Tab.6 hervorgeht,lassen sich keine Unterschiede in der Proteaseaktivität zwischen Standard- und keimfrei aufgezogenen

Tieren feststellen,ausser bei Weibchen im 2.Ventrikel am 2. Tag (2α=0,05).Zur Abklärung dieses Umstandes wurde der Einfluss des mit Aethylenoxyd sterilisierten Futters auf die Proteasenaktivität geprüft.Dazu wurden einige Proteasenbestimmungen im 2.Ventrikel am 2. Tag bei Standard-Weibchen durchgeführt,die mit sterilem Futter aufgezogen waren.Bei diesen Tieren zeigte sich nun auch eine Tendenz zu höheren Werten,wie man sie bei keimfreien Tieren mit sterilem Futter beobachten kann(Tab.6).Diese beiden Gruppen unterscheiden sich statistisch nicht voneinander.Daraus lässt sich schliessen,dass das sterilisierte Futter einen Einfluss auf die Proteasenaktivität ausübt,und dass der Unterschied zwischen Standardtieren mit normalem Futter und keimfreien Tieren nicht auf eine vom keimfreien Tier ausgehende Wirkung zurückzuführen ist. Es scheint,dass der erste Abfall der Proteasenaktivität im 2.Ventrikel beim Weibchen mit sterilem Futter später erfolgt.

Aus diesem Grund ist die Wirkung einer Bakterienprotease auszuschliessen.Die gemessene Aktivität kann einer tiereigenen Protease zugeschrieben werden.

	Männchen 2.Ventrikel					Männchen 3.Ventrikel				
	1.Tag	2.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag
	6,6	4,3	0,7	0,5	0,4	5,7	14,8	9,4	1,0	3,0
	6,7	28,3	2,6	1,2	0,1	4,0	22,9	23,1	6,0	1,2
	3,3	6,6	10,6	0,2	0,1	7,1	9,5	7,6	2,2	0,9
	9,3	3,1	1,0	0,2	0,2	5,9	21,3	3,9	4,5	2,3
	3,7	11,1	3,4	4,9		6,1	11,5	23,0	2,3	1,3
						9,9	18,4	4,1	4,7	
						2,5	3,1	22,0	1,3	
						8,0	10,2	5,9	1,4	
						4,6	6,6	12,9	1,2	
						3,2	16,7	3,9	1,2	
$\bar{x}$	7,6	10,6	4,6	1,4	0,2	5,7	14,0	11,5	2,5	1,7
s	1,7	7,1	4,5	1,9	0,1	2,2	5,6	8,1	1,8	0,8
N	5	5	5	5	4	10	10	10	10	5

TABELLE 4 : Proteaseaktivität im Mitteldarm pro Standardmännchen
* Photospektrometrische Absorptionswerte . 10^2

	Weibchen 2.Ventrikel								Weibchen 3.Ventrikel							
	1.Tag	2.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	1.Tag n.E.	2.Tag n.E.	3.Tag n.E.	1.Tag	2.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	1.Tag n.E.	2.Tag n.E.	3.Tag n.E.
	10,4	0,3	39,1	0,1	1,1	3,2	12,3	20,8	24,3	20,3	11,2	1,0	3,0	3,7	7,3	8,6
	34,4	7,2	16,4	2,4	5,0	1,6	5,1	7,0	21,3	24,2	5,1	7,0	1,7	1,5	5,8	5,3
	22,9	1,3	23,4	3,3	21,3	2,7	04,4	35,8	20,5	21,1	1,0	7,0	2,2	0,1	4,5	5,6
	10,3	0,1	55,9	1,0	30,7	1,1	33,3	10,3	15,0	13,5	5,8	7,3	1,6	1,3	3,8	6,0
	7,0		17,3	0,1	1,8	3,1	51,6	23,1	19,5	35,7	6,3	2,6	0,8	1,2	3,9	
							36,1		11,1	28,1	8,1	4,7		3,2	4,8	
							25,4		10,4	20,9	1,1	4,2			5,1	
									11,0	23,1	0,0	3,5				
									11,0	26,5	14,2	4,5				
									16,5	38,4		6,1				
$\bar{x}$	18,1	2,4	30,4	1,3	14,6	5,1	30,1	20,6	16,0	24,9	8,0	4,8	1,8	2,3	5,0	6,4
	10,3	3,1	16,5	1,0	14,5	4,0	14,3	11,9	5,0	7,5	4,0	2,1	0,8	0,9	1,3	1,6
N	5	5	5	5	5	5	7	5	10	10	9	10	5	6	7	4

TABELLE 5 : Proteaseaktivität im Mitteldarm pro Standardweibchen.
n.E. = nach 1.Eiablage.

	Männchen 2.Ventrikel		Männchen 3.Ventrikel				Weibchen 2.Ventrikel			Weibchen 3.Ventrikel			
	keimfrei	Standard	keimfrei		Standard		keimfrei	Standard		keimfrei		Standard	
	1.Tag	1.Tag	1.Tag	2.Tag	1.Tag	2.Tag	2.Tag	*2.Tag	2.Tag	1.Tag	2.Tag	1.Tag	2.Tag
	[illegible]	4,9	1,1	3,6	3,5	4,0	4,7	10,5	0,2	6,4	10,9	3,3	26,8
	[illegible]	5,2	4,1	2,3	5,0	5,8	12,0	0,8	1,2	9,8	16,3	5,5	26,0
	[illegible]	13,7	2,1	13,2	6,2	4,2	5,9	10,3	6,4	8,5	9,4	4,1	10,4
	[illegible]	[illegible]	0,4	0,7	3,3	6,6	15,2	5,7	0,2	1,5	28,4	7,8	12,2
	[illegible]	[illegible]	5,0	5,5	7,2	9,7		1,2	5,4		23,7	6,4	7,6
	[illegible]	0,6	2,1	3,7	5,0	4,6			2,1			22,7	15,4
	[illegible]	[illegible]	2,1	5,9	3,1	4,7			0,7			23,2	11,1
		2,2	2,7	4,0	0,6				0,4			7,5	20,1
		2,4		5,0	5,5							11,9	36,8
												6,0	21,2
$\bar{x}$	4,2	6,9	3,5	7,4	4,1	5,7	9,4	5,7	2,0	6,5	17,8	9,8	18,7
σ	3,3	6,4	2,4	2,3	2,3	1,9	4,3	4,7	2,4	3,6	8,1	7,2	9,1
N	7	9	8	9	9	7	4	5	8	4	5	10	10

TABELLE 6 : Vergleich der Proteaseaktivität bei keimfrei aufgezogenen und Standardtieren.
*Standardtiere mit sterilem Futter.

8. HAEMOLYMPHPROTEINE

8.1. Methode

Die Elektrophorese der Hämolymphproteine wurde auf Cellogelstreifen(Beckman/Spinco) durchgeführt.Die Hämolymphe wurde dem Tier durch Abschneiden einer vorderen Extremität entnommen und mit einem Beckman Sample Applicator(0,25 µl) auf die Membranfolie aufgetragen.Die Trennung der Fraktionen erfolgte bei einem pH von 8,6 in Barbiturat-Veronal-Puffer und dauerte 45 Minuten bei 2ooV.Zur Anfärbung der Fraktionen diente Ponceaurot S.Die densitometrische Auswertung erfolgte im Beckman Analytrol-Gerät, dessen Schreiber die Fläche der Fraktionen direkt in Form von Zacken aufzeichnete.Diese wurden total für die ganze Kurve ausgezählt,und davon die jeweiligen prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen berechnet.Wie schon Emmerich(197o) feststellte, sind die Cellogelstreifen von sehr ungleicher Qualität,sodass sehr viele Versuche durchgeführt werden mussten,um representative Bandenmuster zu erhalten.

8.2. Allgemeine Kenntnisse über Hämolymphproteine

Ueber die Hämolymphproteine bei Insekten sind in letzter Zeit viele Arbeiten publiziert worden.Das Ziel dieser Untersuchungen besteht meistens in der Klärung der hormonellen Kontrolle der Eireifung und dem damit verbundenen Proteinstoffwechsel.Man weiss heute,dass die Konzentration und Zusammensetzung der Hämolymphproteine eng mit dem Entwicklungszustand der Tiere verknüpft sind. Zumindest bei einigen Insektenarten kennt man Eiweissfraktionen, die durch Hormone induziert werden.Man findet bei verschiedenen Insekten kurz nach der Adulthäutung einen Anstieg der Proteinkonzentration,die ein Maximum etwa in der Mitte der Eireifung erreicht.Danach fällt der Proteinspiegel wieder ab bis zur Eiablage.Dieser Abfall könnte mit der Aufnahme der Proteine in die Oocyten erklärt werden(Emmerich 197o,Scheurer 1969,Telfer 1953, Sláma 1964,Bier 1962).Ueber die hormonelle Kontrolle dieser Vorgänge herrscht immer noch Unklarheit.Es scheint,dass die Synthese der Hämolymphproteine bei verschiedenen Insektenarten von verschiedenen Hormonen kontrolliert wird(Engelmann und Penny 1966).

Ferner ist es wahrscheinlich,dass verschiedene Hormone spezifische Wirkungen haben auf verschiedene Proteinsynthesen(Scheurer 1966). Teilweise werden die Proteine durch neuroendokrine Faktoren,wie CC-Hormon stimuliert(Scheurer 1969).Bei spezifischen,geschlechtsgebundenen Weibchenproteinen findet man oft einen Einfluss des CA-Hormons.Die Hämolymphproteinkonzentration kann direkt beeinflusst sein von CA-Hormon,d.h. dieses Protein wird nur bei CA-Aktivität synthetisiert(Lüscher 1968,Engelmann 1965a,Thomas und Nation 1966).In anderen Fällen zeigt sich nur eine indirekte Wirkung.Hier stimuliert das Aktivationshormon den Proteinstoffwechsel,und dieser wirkt seinerseits auf die Sekretion der CA.Das Hormon der CA ermöglicht dabei nur die Aufnahme der Proteine in die Oocyten und bewirkt damit einen indirekten Abfall der Proteinkonzentration.

Für hemimetabole Insekten liegen bereits einige Arbeiten vor über Hämolymphproteine,z.B. für Oncopeltus fasciatus(Terando 1966, 1967),Pyrrhocoris apterus(Sláma 1964,Emmerich 197o) und Dysdercus intermedius(Hollweg 197o),wobei hier zu bemerken ist,dass sogar bei diesen naheverwandten Arten erhebliche Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Hämolymphe zu finden sind.

8.3. Hämolymphproteinmuster bei Dysdercus fasciatus

Bei Dysdercus fasciatus trennen sich die Hämolymphproteine in insgesamt 9 Banden,sechs kathodische und drei anodische.Schon Emmerich(197o) ist bei Pyrrhocoris die hohe Zahl an kathodischen Proteinen,trotz stark alkalischem pH,aufgefallen,ohne eine Erklärung dafür geben zu können.

Im folgenden werden nun die Hämolymphproteinfraktionen des 5. Larvenstadiums und der adulten Weibchen und Männchen besprochen, und es wird versucht,einen Hinweis auf die vorhergenannten Hypothesen zu finden.

5.Larvenstadium: Da Emmerich(197o) und Hollweg(197o) keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern im 5.Larvenstadium feststellen konnte,verzichtete ich auf eine getrennte Untersuchung. Wie aus Tab.7 und Abb.2 ersichtlich ist,kommen bei frischgehäuteten Tieren des 5.Larvenstadiums die Banden 1,3,4,5,6,7 und 8 vor.In diesem Muster ändert sich während der ganzen neun Tage

des Larvenstadiums qualitativ nichts mehr.Hier zeigt sich bereits ein Unterschied zu Pyrrhocoris,wo das Bild durch das Neuauftreten und wieder Verschwinden von Fraktionen bestimmt wird.

Die Fraktinen 7 und 8 zusammen machen bei Dysdercus mit 5o-6o% den grössten Anteil am Gesamtprotein aus.Wie aus Tab.7 und Abb.2 ersichtlich ist,unterliegen sie quantitativen Aenderungen.

Die beiden Fraktionen sind nie ganz voneinander getrennt,was auf eine grosse Aehnlichkeit hinweist.Dies drückt sich auch in ihren alternierenden Konzentrationsänderungen aus.Wird die Summe der beiden Fraktionen betrachtet,erfolgt nach der Häutung bis zum 5. Tag eine Konzentrationsabnahme und danach bis zum 7. Tag eine -zunahme.Kurz vor der Häutung sinkt die Kurve nochmals leicht ab. Sie entspricht sehr wahrscheinlich der Gesamtproteinkurve,denn sie gleicht stark derjenigen von Dysdercus intermedius(Hollweg 197o).

Weiterhin sind die Fraktionen 5 und 6 von quantitativen Veränderungen betroffen.Auch diese beiden Fraktionen sind eng miteinander verbunden.Während Fraktion 6 während des 5.Larvenstadiums langsam abnimmt,steigt Fraktion 5 bis zur Adulthäutung an.

Die restlichen Fraktionen sind nur geringen Konzentrationsschwankungen unterworfen.

Ueber die Bedeutung und Kontrolle der Hämolymphproteine während der Larvenstadien,ist nur wenig bekannt.Terando(1966) erwähnt den Einfluss von Ecdyson und Brettschneiderová und Novák (1965) fanden eine Stimulierung der Proteinsynthese durch CA-Hormon im 5.Larvenstadium.

Männchen adult: Das Bild des frischgehäuteten,adulten Männchens unterscheidet sich qualitativ und quantitativ nur wenig vom 5.Larvenstadium.Es tritt keine neue,spezifische Adultfraktion auf,wie z.B. bei Pyrrhocoris apterus.Bis zum 3. Tag konnte Fraktion 6 nicht mehr getrennt von Fraktion 5 erfasst werden,da sie meistens mit dieser verschmolzen war.Schon bald zeigen sich nun aber starke quantitative Veränderungen.Während Sláma(1964) bei Männchen während der Adultphase keine Konzentrationsänderungen findet,und das auf den geringeren Proteinverbrauch der Spermatogenese zurückführt,zeigt sich bei Dysdercus fasciatus ein

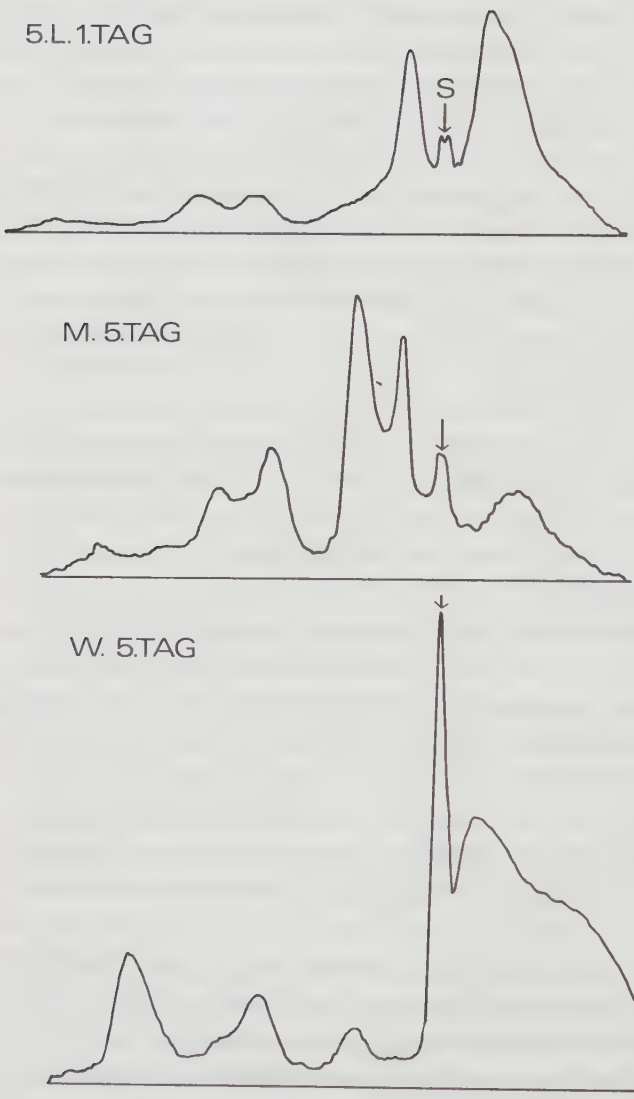
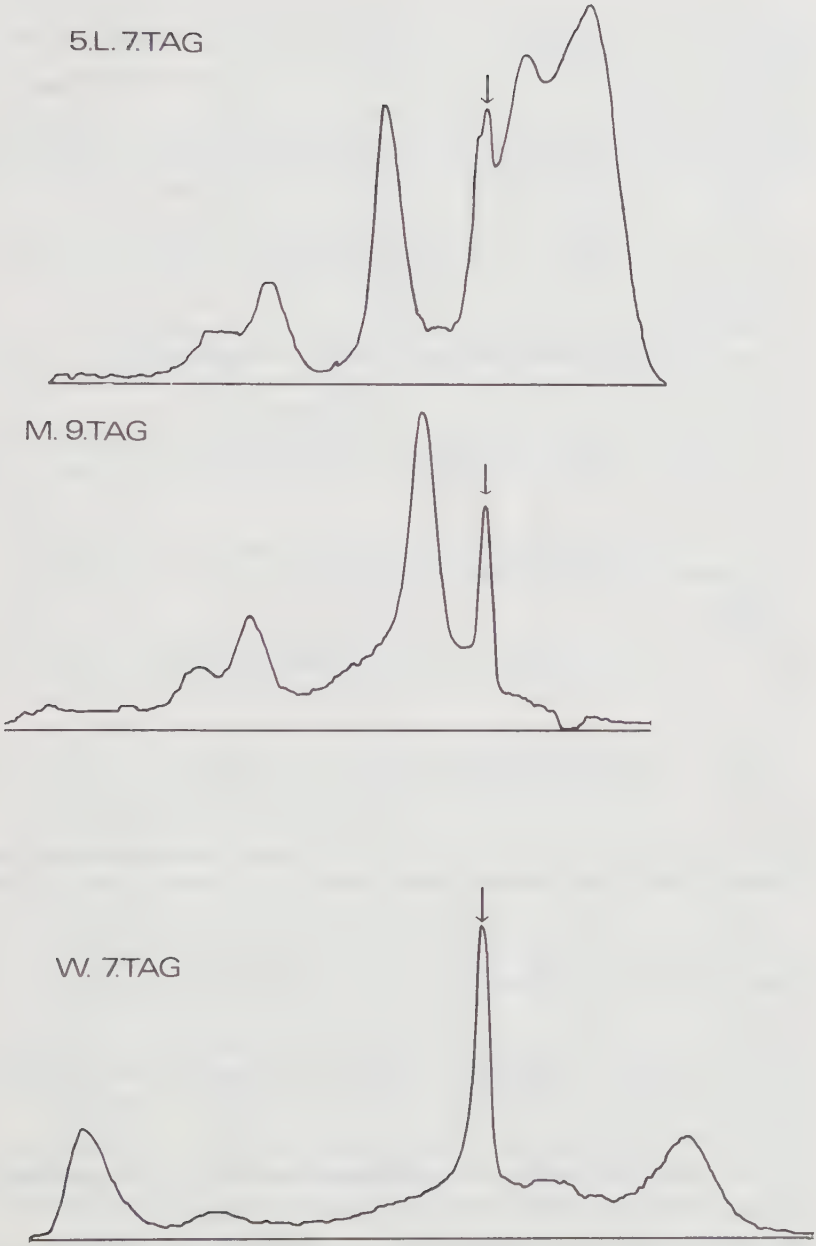


Abb.II: DENSITOGRAMME DER CELLOGELELEKTROPHORESESTREIFEN



M=Männchen, W=Weibchen

S=Startpunkt, L=Larvenstadium

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alter 1.Tag 5.L. $\bar{x}$ N=14	2,6		6,8	6,6	1o,2	13,6	46,7	11,3	
s	1,2		1,3	2,o	5,6	5,6	6,5	3,1	
5.Tag 5.L. N=9	1,4		8,9	7,9	17,9	1o,o	17,9	35,3	
	o,4		1,5	1,5	3,3	2,5	7,3	4,2	
7.Tag 5.L. N=2o	1,6		5,4	7,8	18,1	3,6	31,3	31,6	
	o,9		2,o	1,3	4,8	1,6	9,1	6,8	
9.Tag 5.L. N=17	1,6		6,2	9,4	19,5	3,5	31,8	27,4	
	o,7		2,3	3,1	3,2	2,1	8,9	7,1	
1.Tag M. N=9	2,2		6,2	9,5	21,3		41,2	18,9	
	o,7		1,9	2,9	2,8		7,8	3,7	
3.Tag M. N=9	5,1		19,o	19,7	45,2		9,9	o,7	
	1,5		4,4	4,3	8,5		7,6	1,5	
5.Tag M. N=5	3,5		18,o	15,2	39,2	17,o	7,1		
	1,5		5,8	3,4	9,1	5,2	7,8		
9.Tag M. N=4	2,6		12,o	17,3	15,2	47,7	4,3	o,9	
	1,o		1,4	1,4	2,o	3,5	2,1	o,8	
1.Tag W. N=2o	1,3		5,5	1o,4	21,1		35,2	25,7	
	o,3		1,9	4,3	4,1		5,7	7,5	
3.Tag W. N=6	1,9	8,7	9,7	15,7	33,7		2o,5	9,4	
	1,2	3,5	4,4	5,5	11,3		7,5	11,1	
5.Tag W. N=13	1,4	15,o	5,1	13,8	9,5		25,o	27,5	1,4
	1,1	4,5	4,5	3,2	4,o		1o,4	1o,4	1,8
7.Tag W. N=8	o,4	24,7	4,o	5,3	5,4		21,4	29,5	3,4
	o,4	6,3	4,4	2,4	3,2		2,2	1o,7	2,1

TABELLE 7 : Hämolymphproteinfraktionen des 5.Larvenstadiums und der adulten Männchen und Weibchen von Dysdercus fasciatus in Prozenten des Gesamtproteins. L.=Larvenstadium, M.=Männchen, W.=Weibchen, N=Anzahl der untersuchten Tiere.

starker Konzentrationsabfall bei den hauptsächlichsten Fraktionen. Bei Dysdercus intermedius(Hollweg 197o) ergibt sich eine abfallende,parallele Kurve zu derjenigen der Weibchen.Es kann somit angenommen werden,dass auch bei den Männchen eine gleiche hormonelle Aktivität(Sláma 1964),aber auch ein vermehrter Proteinverbrauch,wie bei den Weibchen,vorzuliegen scheint.

Die Fraktionen 7 und 8,die anfänglich zusammen den Hauptteil der Gesamtproteine ausmachen,sinken nun sehr rasch ab.Möglicherweise macht sich dieser Abfall vorerst nicht stark bemerkbar bei einer Gesamtproteinbestimmung,da Fraktion 5 und 6 nun verstärkt hervortreten.Während Fraktion 5 am 3. Tag ein Maximum erreicht und dann wieder langsam abfällt,steigt die Konzentration der Fraktion 6 langsam an und macht am 9. Tag fast 5o% des Gesamtproteins aus.

An dieser Stelle soll auf die Aehnlichkeit des Kurvenverlaufs der Fraktion 5 und der Proteasewerte des vorhergehenden Kapitels hingewiesen werden.Es ist möglich,dass diese beiden Stoffwechselvorgänge miteinander verbunden sind und durch das gleiche Hormon kontrolliert werden.

Ueber die Bedeutung der männlichen Proteine und deren Konzentrationsverlauf lässt sich aus der Literatur nichts aussagen.

Weibchen adult: Auch beim Weibchen sind am ersten Tag nach der Häutung keine qualitativen oder quantitativen Proteinmusterveränderungen gegenüber dem 5.Larvenstadium zu sehen(Tab.7,Abb.2). Fraktion 6 kann hier auch nicht gesondert beobachtet werden,da sie ebenfalls eng verbunden ist mit Fraktion 5.Im Gegensatz zu den Männchen ist sie aber während des ganzen Adultzyklus nicht erfassbar.

Vom 3. Tag an zeigen sich nun vielfältige Veränderungen des Proteinmusters.

Fraktion 5 zeigt denselben Verlauf wie beim Männchen.Sie erreicht am 3. Tag ein Maximum,welches mit dem,einen Tag früher auftretenden Maximum der Proteaskurve korreliert werden könnte. Danach sinkt die Konzentration bis zu einem tiefen Wert vor der Eiablage ab.Es wäre möglich,dass dieses Protein,welches während der Sekretionsphase des Aktivationshormones mit der Proteaseakti-

vität im 3.Ventrikel ansteigt und während der Eireifung wieder abfällt,ein CA-kontrolliertes Protein ist und in die Oocyten aufgenommen wird.

Die Gesamtproteinkurve von Dysdercus fasciatus-Weibchen wiederspiegelt diesen Abfall nicht(Herzog 1965).Das kommt daher, dass auch hier wieder die Fraktionen 7 und 8 den Hauptanteil am Gesamtprotein ausmachen und damit die Veränderungen weniger konzentrierter Fraktionen überdecken.Ihr wechselndes Zu- und Abnehmen,drückt sich auch in der Kurve von Herzog aus.

Auffallend ist die Aehnlichkeit der Fraktionen 7 und 8 und der Gesamtproteinkurve einerseits und der Proteaseaktivität im 2.Ventrikel des Weibchens andererseits.Hier könnte vielleicht ein Stoffwechselzusammenhang gefunden werden,der weitere Hinweise auf eine verschiedenartige hormonelle Kontrolle verschiedener Proteine liefern würde.

Eine weitere Besonderheit des weiblichen Proteinmusters ist das Auftreten einer neuen Fraktion am 3. Tag nach der Adulthäutung.Dies Fraktion kann weder im 5.Larvenstadium,noch beim Männchen in messbaren Konzentrationen nachgewiesen werden.Ihre Konzentration steigt langsam an,um am 7. Tag kurz vor der Eiablage ein Maximum von 25% des Gesamtproteins zu erreichen.

Eine in ihrer Spezifität und ihrem Konzentrationsverlauf gleiche Fraktion fand auch Hollweg(197o) bei Dysdercus intermedius.Seine Untersuchungen erstreckten sich bis zur zweiten Eiablage,und er fand nach der ersten Eiablage wieder einen langsamen Abfall der Konzentrationskurve.Da ihr Auftreten zeitlich mit der ersten Ovarentwicklung und mit der von Edwards(1969) gefundenen Flugmuskelhistolyse der Weibchen zusammenfällt,schlägt er eine Korrelation zwischen dieser Fraktion und Vorgängen der Eireifung bzw. Dottereinlagerung vor.Da weitere Untersuchungen noch fehlen,kann diese Frage nicht diskutiert werden.

Weiterhin muss hier noch das Neuauftreten einer Fraktion 9 erwähnt werden,deren Konzentration aber immer äusserst gering bleibt.

Alle restlichen Fraktionen verändern sich nicht stark.

Keimfrei aufgezogene Tiere: Einige Untersuchungen wurden mit keimfrei aufgezogenen Tieren im 5.Larvenstadium und als Adulttier gemacht.Wie bei den Proteasenbestimmungen zeigten sich auch hier keine Unterschiede zwischen keimfreien und Standard-Tieren.Da nur einige Stichproben durchgeführt werden konnten,ist eine statistische Beurteilung der Werte nicht möglich.Die verfügbaren Zahlen liegen jedoch immer innerhalb der Standardwerte-Skala(Tab.8).

Fraktion	1	3	4	5	6	7	8
Alter							
1.Tag 5.L.	1,4	5,4	8,6	13,6	16,3	43,4	11,3
	1,5	2,9	6,8	7,8	18,5	48,3	14,2
	2,3	3,1	6,9	5,o	15,1	51,2	16,3
	3,1	5,9	9,4	15,9	15,6	25,6	14,5
	1,2	6,7	8,2	7,o	15,5	46,2	15,2
	o,3	8,7	9,o	17,4	15,5	39,2	9,9
7.Tag 5.L.	1,3	4,6	8,4	12,3	2,5	39,8	31,1
	o,4	4,2	4,2	23,1	4,2	37,7	26,2
	1,6	7,o	5,4	21,o	3,6	29,7	31,7
	2,5	9,3	5,9	15,8	1,9	37,3	27,3
9.Tag 5.L.	1,3	5,9	5,o	2o,6	4,4	38,2	24,6
	2,1	9,4	5,o	19,6	2,1	33,4	28,5
	o,4	3,o	8,1	23,7	2,1	4o,7	22,o
3.Tag M.	3,7	19,7	14,8	53,1		8,7	
	3,3	19,6	24,6	39,4		13,1	
1.Tag W.	1,1	6,8	12,5	18,2		36,4	25,o

TABELLE 8 : Hämolymphproteinfraktionen bei keimfreien Tieren in Prozenten des Gesamtproteins. L.=Larvenstadium,M.=Männchen,W.=Weibchen.

9. DISKUSSION

Bedeutung der Darmflora: Wie aus den vorliegenden Untersuchungen ersichtlich ist,kann den Darmbakterien von Dysdercus fasciatus keine offensichtliche Symbioseleistung zugesprochen werden.Die Bakterien zeigen weder eine Protease- noch eine Wuchsstoffproduktion,die für das Tier unentbehrlich wären.

Es ist wahrscheinlich,dass es sich bei den von Glasgow(1914) und Kuskop(1923) beschriebenen Keimen um Enterokokken handelt, die im Laufe meiner Untersuchungen durch Züchtung und Aesculin-Test bestimmt werden konnten.Die Bakterien liessen sich durch den Vergleich der Ausstrichpräparate aus dem Darm und der Kultur homologisieren.Die Tatsache,dass sich die Keime züchten lassen, weist aber bereits darauf hin,dass es sich nicht um einen hochspezialisierten,innig angepassten Symbiont handelt.Koch(1962) wertet das Faktum,dass gewisse Bakterien aus dem Darm nicht gezüchtet werden können neben anderen(artspezifische Flora,Lebensnotwendigkeit,Uebertragung) als Beweis für das enge Abhängigkeitsverhältnis vom Tier,also für eine'echte Symbiose'.Andererseits sind Enterokokken aber Darmkeime und sie müssen von Generation zu Generation weitergegeben werden.Da die Uebertragung bei Dysdercus durch Eibeschmierung garantiert wird,und dieser Prozess mit einer grossen Regelmässigkeit stattfindet,ist es erstaunlich,dass diesem Keim keine grössere Bedeutung zukommt,besonders da die Enterokokken viele extrazelluläre Substanzen ausscheiden,darunter auch Proteasen.

Daneben sind die meisten der zusätzlich gefundenen Keime aktive Vitamin-B-Lieferanten,sodass die Voraussetzungen für eine symbiontische Leistung an das Tier gegeben wären.Dass die von Darmbakterien produzierten Vitamine dem Insekt tatsächlich zugute kommen können,hat Kaudewitz(1953) bewiesen,der bei Tenebrio, dank den Darmbakterien, mit Mangeldiäten noch ein gewisses Wachstum beobachten konnte.

Bei den vorliegenden Resultaten muss berücksichtigt werden, dass die Versuchstiere über viele Generationen in Grosszucht gehalten wurden unter den günstigsten Bedingungen und mit optima-

ler Nahrung.In der Natur sind die Verhältnisse variabler und entsprechen nicht immer voll den Anforderungen.Die Tiere sind auf den Baumwollpflanzen öfters an Stengeln und Blättern zu finden, verhalten sich also vielleicht wie Siebröhrensauger,bevor sie die Kapseln befallen.Möglicherweise liefern ihnen die Bakterien im Darm unter diesen Umständen die nachgewiesen mangelnden Vitamine. Ob die Mikroorganismen unter solchen Verhältnissen eine lebensnotwendige Rolle übernehmen,wurde nicht untersucht.

Wie aus der Einleitung ersichtlich ist,stehen die Pyrrhocoriden am Anfang einer Entwicklung vom carnivoren zum phytophagen Typus und damit am Anfang eines Symbiontenverhältnisses.Das Auftreten eines konstanten Darmkeimes,die Bakterienübertragung auf die folgende Generation,die Bildung von zwar noch sterilen Ausstülpungen am Ende des Mitteldarmes,die fast ausschliesslich phytophage Lebensweise und die obenerwähnte Art einer lockeren Symbiose,würde die Ausgangsstellung von Dysdercus fasciatus in der Phylogenie der Heteropterensymbiose rechtfertigen.

Der Darmflora kommt sicher auch eine Schutzfunktion zu gegenüber fremden,dem Insekt vielleicht schädlichen Keimen.Man findet neben dem Hauptkeim immer nur eine beschränkte Anzahl Begleitkeime,die sich behaupten können.Es ist bekannt,dass im Darm von Insekten ein noch unbekanntes bakterizides Prinzip wirkt,durch welches die Bakterienflora stark eingeschränkt wird(Duncan 1926). Glasgow(1914) vermutet,dass die Bakterien bei Heteropteren die Entwicklung fremder Keime hemmen.Antibiotika mit ungewöhnlichen Eigenschaften konnten aus dem Darm von verschiedenen larvalen Dipteren,Cimex und Rhodnius extrahiert werden(Duncan 1926).Enterokokken und Laktobazillen,die im Darm von Dysdercus gefunden wurden,sind Exotoxinbildner und sie vermögen Zucker zu Milchsäure zu vergären.Diese Ausscheidungsprodukte könnten wegen ihrer direkten bakteriziden Wirkung,bzw. einer pH-Senkung der Grund für eine Bakterienunterdrückung sein.

Auf eine gewisse Wechselbeziehung zwischen Insekt und Darmbakterien weist auch die Vergrösserung des 3.Ventrikels und die Verflüssigung des Darminhaltes bei keimfreien Tieren hin.Stark erweiterte Blinddärme und Veränderungen des Kotes wurden auch

bei keimfreien Meerschweinchen gefunden(Koch 1962).Andererseits beobachtete Drepper(1967) bei keimfreien Ratten und Mäusen durch Verabreichung von sterilem Futter vergrösserte Blinddärme.Er bemerkt dazu,dass es sich dabei um eine Anormalität oder um eine Normalität handeln kann.Die Ursachen dieser Veränderungen sind nicht geklärt.

Somit ist abschliessend zu sagen,dass die symbiontischen Beziehungen bei Dysdercus fasciatus,wenn überhaupt vorhanden,von sehr primitiver Art sind,und entgegen der Ansicht von Buchner (1953),Glasgow(1914) und Kuskop(1923) eher von Kommensalismus gesprochen werden sollte.Gewisse Anzeichen deuten aber darauf hin,dass sich diese Form des Zusammenlebens im Laufe der Insekten-Phylogenie zu einer echten Symbiose entwickeln könnte.

Antimicrobiaverabreichung: Bei den Antimicrobia-Versuchen zeigten sich schon ausgeprägte Ausfallserscheinungen bei o,1% iger Verabreichung.Diese Symptome werden in der Literatur meist einer Avitaminose zugeschrieben,die durch die fehlenden Symbionten zustande kommt.Solche Schlüsse sollten aber nicht zu schnell gezogen werden,da eine Avitaminose beim Menschen auch direkt durch Antibiotika ausgelöst werden kann(Kettel Diss. 1966),indem diese Resorptionsstörungen der Darmschleimhaut oder aber eine Antivitaminwirkung auslösen.Weiterhin vermögen die Antibiotika auch die normale Darmflora zugunsten eines vitaminspeichernden Keimes zu verändern.Durch solche Prozesse würde sehr stark in den Insektenstoffwechsel eingegriffen und die gleichen Avitaminoseerscheinungen hervorgerufen werden.Da die Antinicrobia-Verabreichung bei Dysdercus keine Keimfreiheit bewirkte,aber die gleichen Symptome beim Tier zur Folge hatte,kann mit Sicherheit auf eine toxische Wirkung der antibakteriellen Stoffe geschlossen werden.

Dass solche schädigenden Einflüsse nicht nur beim Menschen vorkommen,hat Singh(197o) bewiesen,indem er bereits keimfreien Insekten Antimicrobia verabreichte und toxische Symptome bei den am häufigsten angewendeten,antibakteriellen Stoffen beobachten konnte.'Safe levels' liegen oftmals bei Konzentrationen,wo keine bakterizide Wirkung des Antibiotikas mehr zu erwarten ist.Die

schädlichen Mechanismen sind hier noch nicht geklärt.Da die Tiere jedoch bereits keimfrei waren,kann eine direkte toxische Wirkung auf das Tier angenommen werden.Dadurch könnten auch die unterschiedlichen Resultate bei keimfreien Tieraufzuchten erklärt werden.Während Wollmann(1926) bei Blatella germanica,die er über 14 Generationen aseptisch züchtete keine Mangelerscheinungen beobachten konnte,beschreibt Selmair(1962) bei der gleichen Art Ausfallserscheinungen bei durch Aureomycin keimfrei erhaltenenen Tieren.

Auf Grund dieser Resultate sollte die Eliminierung der Symbionten nicht mit Antimicrobia durchgeführt werden,oder wenigstens nur mit unschädlichen Konzentrationen,die noch bakterizid wirken.

Aethylenoxyd sterilisiertes Futter: Die Aethylenoxyd-Sterilisation der Insektennahrung stellt eine brauchbare Methode für die keimfreie Aufzucht dar,obwohl eine geringfügige Wirkung auf die Eiproduktion festzustellen ist.Die Möglichkeit der Verwendung des Normalfutters ist ein grosser Vorteil dieser Methode,wenn sich die Untersuchung auf die Darmflora bezieht,wobei eine sterile Nahrung notwendig ist,und wenn wegen der strengen Nahrungsspezifität des Insekts keine synthetische Diät hergestellt werden kann. Durch Verabreichung an nicht keimfreie Tiere kann eine eventuelle Toxizität im voraus ermittelt werden,sodass es nicht zu Wirkungsüberschneidungen kommt,wie bei der Antimicrobia-Verabreichung.

Hämolymphproteine und Proteasen: Die Untersuchungen der Hämolymphproteine und Proteasen ergaben keine unterschiedlichen Resultate bei keimfreien und normalen Tieren,obwohl gewisse vorkommende Darmkeime,wie Proteus,Pseudomonas und Enterokokken,aktive Proteaseausscheider sind und von Tóth(195o) auch als Proteinquellen angesehen werden.

Die Resultate bei normalen Tieren sind an sich interessant, da man bis anhin annahm,dass bei Dysdercus fasciatus keine Protease wirksam sei(Ford 1962),und da das Hämolymphproteinmuster bei dieser Insektenart noch nie beschrieben wurde.Das Ziel der Hämolymphprotein- und Proteasenuntersuchungen ist meistens die Aufklärung eines Zusammenhangs zwischen diesen Prozessen und einer hormonellen Steuerung.Wie schon bei den Resultaten ausge-

führt wurde,konnten mehrere Autoren einen gleichzeitigen Anstieg und Abfall von Insektenhormonen und Protein- und Proteasenaktivitäten bestätigen.Die genauen Regulationsmechanismen,die auf den Proteinstoffwechsel einwirken,sind meist erst hypothetisch belegt.Es zeigt sich,dass die einzelnen Proteinfraktionen von verschiedenen Hormonen kontrolliert werden.Spezifische Weibchenproteine werden z.B. von CA-Hormon gesteuert,während andere Fraktionen und die Proteasen dem CC-Hormon unterstellt sein können.

Dass die Konzentration von gewissen Hämolymphproteinfraktionen und die Proteasenaktivität durch Eibildungsvorgänge bestimmt werden,wird aus den Werten der beiden untersuchten Parameter offensichtlich.

Beim Beginn der Eireifung sind die Konzentrationen sehr hoch und sinken dann ab bis vor der Eiablage.Die Proteasen im 3.Ventrikel werden kaum mehr produziert,weil weniger proteinverbrauchende Stoffwechselvorgänge stattfinden,und gewisse Proteinfraktionen verschwinden aus der Hämolymphe,weil sie in die Eier aufgenommen werden.In dieser Zeit ist das CA-Hormon wirksam,das durch die erhöhte Proteinkonzentration in der Hämolymphe stimuliert wird.Diese wiederum kommt durch die erhöhte Proteaseaktivität, d.h. den erhöhten CC-Hormonspiegel zustande.

Es ist auffällig,dass sich die Werte der Fraktion 5 und der Proteaseaktivität im 3.Ventrikel des Weibchens und im 3. und 2. Ventrikel des Männchens in ihrem Verlauf entsprechen.Daraus könnte man schliessen,dass diese Prozesse in irgendeiner Art gekoppelt sind.Möglich wäre eine gleiche hormonelle Steuerung durch das Aktivationshormon,oder aber eine Verwertung der 5.Fraktion mit Hilfe des CA-Hormons in Eireifungs- und Spermatogeneseprozessen.Es ist hier auch zu bemerken,dass die Männchen entgegen Sláma(1965) eine Anhäufung der Proteasen und gewisser Proteinfraktionen am 2. Tag zeigen,wenn die Gesamtkonzentrationen auch etwas tiefer liegen als beim Weibchen.

Neben dem Auftreten der Fraktion 2 ist auch das sprunghafte Zu- und Abnehmen der Fraktion 7 und 8 ein spezifisch weibliches Merkmal.Erstaunlicherweise trifft man den gleichen Kurvenverlauf bei der Proteasenaktivität im 2.Ventrikel.Es wäre möglich,dass

hier ebenfalls eine Korrelation besteht zwischen spezifischer Protein- und Proteasenbildung mit Hilfe eines speziellen Hormons, besonders da beim Männchen der Konzentrationsverlauf der Proteasen im 2.Ventrikel gleich verläuft wie im 3.Ventrikel,und die Fraktionen 7 und 8 dementsprechend abfallen.

Es zeigt sich bei diesen Resultaten,dass Proteinstoffwechselvorgänge von verschiedenen Systemen aus kontrolliert werden,wobei die Steuerung des effektiven Geschehens trotz vieler Bearbeitung noch nicht geklärt ist.

ZUSAMMENFASSUNG

1. An der Baumwollwanz Dysdercus fasciatus Sign. wurde die Darmflora und deren Bedeutung für das Tier untersucht.Die Pyrrhocoriden stehen unter den Heteropteren am Anfang einer phylogenetischen Entwicklung zur Endosymbiose hin.

2. Dysdercus zeigt eine konstante Darmbesiedlung von vier bis sechs Keimtypen,die in Trypticasebouillon gezüchtet werden können. Während des Lebenszyklus ist die Darmflora nur geringfügigen Veränderungen unterworfen.

3. Enterokokken wurden als die konstanteste und spezialisierteste Keimart erkannt und den von anderen Autoren beschriebenen Kokkenformen gleichgesetzt.Die Bakterienübertragung von Generation zu Generation erfolgt durch Eibeschmierung.

4. Verabreichung verschiedener,antibakterieller Stoffe führte nicht zu Keimfreiheit und hatte toxische Symptome zur Folge.

5. Zur keimfreien Aufzucht von Dysdercus wurde ein spezielles Verfahren der Eisterilisation und der Standardfutter-(Baumwollsamen-) Sterilisation mit Aethylenoxyd ausgearbeitet.

6. Die keimfreien Tiere zeigten keine Ausfallserscheinungen hinsichtlich der Larvalentwicklungsdauer,der Sterblichkeit und der Eigelege.

7. Entgegen der bis heute üblichen Ansicht besitzen die Baumwollwanzen ein tiereigenes Proteasesystem im Mitteldarm,das von der Darmflora nicht beeinflusst wird.

8. Bei keimfreien Tieren sind die Hämolymphproteinfraktionen nicht verändert.
9. Die Hämolymphproteinelektrophorese ergab sechs kathodische und drei anodische Fraktionen.Darunter wurde ein spezifisches Weibchenprotein gefunden.
lo. Der Vergleich zwischen den Konzentrationen der Hämolymphproteine und Proteasen ergaben Hinweise auf eine Korrelation mit Eibildungsvorgängen.
11. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten,dass den Darmkeimen von Dysdercus fasciatus trotz ihren stoffwechselphysiologischen Voraussetzungen keine symbiontische,sondern eine kommensalistische Rolle zufällt.Es werden gewisse Anzeichen diskutiert,die darauf hindeuten,dass sich diese Form des Zusammenlebens im Laufe der Insektenphylogenie zu einer echten Symbiose entwickeln könnte.

LITERATURVERZEICHNIS

BAER,F.& GRIEPENTROG,F.,1969:Langzeitfütterungsversuch an Ratten mit Aethylenoxyd begastem Futter.-Bundesgesundheitsblatt vom 11.April,1o6-1o7.

BIER,K.,1962:Autoradiographische Untersuchungen zur Dotterbildung.-Naturwissenschaften 49,332-333.

BITTER,R.S.& WILLIAMS,O.B.,1949:Enteric organisms from the American cockroach.-J.infect.disease 85,87-9o.

BRETTSCHNEIDEROVÁ,Z.& NOVÁK,V.J.A.,1965:The effect of the juvenile hormone on the protein level in the haemolymph of the bug P y r r h o c o r i s a p t e r u s during metamorphosis.-Zoolog.Jb.(Physiol.) 71,665-668.

BROOKS,M.A.& RICHARDS,G.,1955:Intracellular symbiosis in cockroaches.I.Production of aposymbiotic cockroaches.-Biol. Bull.1o9,22-39.

BUCHNER,P.,1953:Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen.-Birkhäuser Basel/Stuttgart.

BUSNEL,R.G.& DRILHORN,A.,1948:Sur l'utilisation de la vitamine B_2par T e n e b r i o m o l i t o r en présence de sulfonamide.-C.r.Acad.Sci.Paris 226.

DADD,R.H.,1956:Proteolytic activity of the midgut in relation to feeding in the beetles T e n e b r i o m o l i t o r L. and D y t i c u s m a r g i n a l i s L.-J.exp.Biol.33, 311-324.

- 1961:Evidence for humoral regulatin of the digestive secretion in the beetle T e n e b r i o m o l i t o r.-J.exp. Biol.38,259-266.

DAY,M.F.& WATERHOUSE,D.F.,1953:The mechanism of digestion.In Insect Physiology(Edited by Roeder,K.D.) Kap.12,John Wiley New York.

DREPPER,K.,1967:Production of diets for SPF and germ-free animals with special regard to injury of protein value following sterilisation.-Husbandery of Laboratory Animals(Edited by Conalty,N.L.) Academic Press London.

DUNCAN,J.T.,1926:On a bacterial principle present in the alimentary canal of insects and arachnids.-Parasitology 18, 238-252.

EDWARDS,F.J.,1969:Environmental control of flight muscle histolysis in the bug D y s d e r c u s i n t e r m e d i u s. -J.Insect Physiol.15,2o13-2o2o.

EHRHARDT,P.& SCHMUTTERER,H.,1966:Die Wirkung verschiedener Antibiotika auf die Entwicklung und Symbionten künstlich ernährter Bohnenblattläuse(A p h i s f a b a e Scop.).-Z. Morph.Oekol.Tiere 56,1-2o.

- 1968:Einfluss von Ernährungsfaktoren auf die Entwicklung von Säfte saugenden Insekten unter besonderer Berücksichtigung von Symbionten.-J.Insect Physiol.16,725-747.

ENGELMANN,F.,1965:The mode of action of the corpus allatum in adult insects.-Arch.Anat.micr.Morph.exp.54.387-4o4.

- 1966:Control of intestinal proteolytic enzymes in cockroaches.-Naturwissenschaftrn 53,113-114.

FOECKLER,F.,1961:Reinfektionsversuche steriler Larven von Stegobium paniceum L. mit fremden Hefen und die Beziehung zwischen der Entwicklungsdauer der Larven und dem B-Vitamingehalt des Futters und der Hefen.-Z.Morph. Oekol.Tiere 50,119-162.

FORD,J.B.,1962:Studies on the digestive processes of Dysdercus fasciatus Sign..-Ann.appl.Biol.50,355.

FRANK,W.,1956:Entfernung der intrazellulären Symbionten der Küchenschabe durch Einwirkung verschiedener Antibiotika, unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen am Wirtstier und an den Bakterien.-Z.Morph.Oekol.Tiere 44,329-366.

FRIEND,W.G.,SALKELD,E.H.& STEVENSON,J.L.,1959:Acceleration of development of larvae of the onion maggot,Hylemya antiqua (Meig.) by microorganisms.-Canad.Journ.Zool. 37,221-227.

GANTI,Y.& SHANMUGASUNDARAM,E.R.B.,1963:The nature of the proteolytic enzyme system in Corcyra cephalonica St.-J.exp.Zool.153,251-254.

GLASER,R.,1947:The intracellular bacteria of the cockroach in relation to symbiosis.-J.Parasit.32,483-489.

GLASGOW,H.,1914:The gastric carca and the caecal bacteria of the Heteroptera.-Biol.Bull.Wood's Hole 26,101-170.

GOODING,R.H.,1966:In vitro properties of proteinases in the midgut of adult Aedes aegypti L. and Culex fatigans.-Comp.Biochem.Physiol.17,115-127.

GORDON,R.,1968:Observations on the effect of the neuroendocrine system of Blatta orientalis L. on the midgut protease activity of the adult female and the level of infestation with the nematode Hammerschmidtiella diesingi (Hammerschmidt,1838).-Gen.Comp.Endocrin.11,284-291.

- 1970:Synthesis and secretion of intestinal digestive enzymes in the adult female oriental cockroach Blatta orientalis with reference to the neuroendocrine system. -Ann.Entomol.Soc.America 63,416-422.

GREENBERG,B.& BURKMAN,A.M.,1963:Effects of B-vitamins and a mixed flora on the longevity of germ-free adult houseflies Musca domestica L.-Journ.Cell.Comp.Physiol.62, 17-22.

HALFF,L.A.,1956:Untersuchungen über die Abhängigkeit der Entwicklung der Reduviide Triatoma infestans Klug von ihren Darmsymbionten.-Acta Tropica 13,225-253.

HAWKER,L.E.,1962:Biologie der Mikroorganismen.-G.Thieme Stuttgart.

HELLMUTH,H.,1956:Untersuchungen zur Bakteriensymbiose der Trypetiden(Dipteren).-Z.Morph.Oekol.Tiere 44.483-517.

HERZOG,A.,1967:Ernährungs- und Stoffwechseluntersuchungen an Imagines der afrikanischen Baumwollwanze Dysdercus fasciatus (Hem.Pyrr.).-Z.angew.Entomol.60,351-386.

HOLLWEG,G.,1970:Die Hämolymphproteine der Baumwollwanze Dysdercus intermedius im Verlaufe der Entwikklung.-Naturwissenschaftrn 57,104.

HOUSE,H.L.,1965:Digestion.InThe Physiology of Insecta.Academic Press New York and London.

KAUDEWITZ,H.,1953:Die Wuchsstoffverteilung im larvalen Fettkörper von T e n e b r i o m o l i t o r L..-Z.vergl.Physiol. 35,38o-415.
KETTEL,I.,1966:Ueber Nebenerscheinungen bei Antibiotikabehandlung unter besonderer Berücksichtigung der Vitamin-B-Substitution.-Diss.Tübingen.
KHAN,R.M.& FORD,J.B.,1962:Studies on digestive enzyme production and its relationship to the cytology of the midgut epithelium in D y s d e r c u s f a s c i a t u s Sign.(Hem. Pyrr.).-J.Insect Physiol.8,597-6o8.
KOCH,A.,1962:Grundlagen und Probleme der Symbioseforschung. -Medizinische Grundlagenforschung 4,64-156.
KUSKOP,M.,1924:Bakteriensymbiose bei Wanzen(Hemiptera,Heteroptera).-Arch.Protistenkunde 47,35o-385.
LUESCHER,M.,1968:Hormonal control of respiration and protein sythesis in the fat body of the cockroach N a u p h e o t a c i n e r e a during oöcyta growth.-J.Insect Physiol. 14,499-511.
MANCHON,PH.& BUQUET,A.,197o:Détermination et dosage de l'oxyde d'ethylène (Oxirane) et de ses dérivés dans le pain traité par ce fumigant.-Fd Cosmet.Toxicol.8,9-15.
PFLEIDERER,G.& ZWILLING,R.,1966:Ueber eine im physiologischen Bereich native Proteine hydrolysierende Endopeptidase aus dem Darm von T e n e b r i o m o l i t o r.-Biochem.Z.344, 127-14o.
PORTER,G.& BLEBY,J.,1966:Ethylen oxide sterilisation.-J.Inst. Anim.Tech.17,16o-166.
RAO,B.R.& FISK,F.W.,1965:Trypsin activity associated with reproductive development in the cockroach N a u p h o e t a c i n e r e a (Blattaria).-J.Insect Physiol.11,961-971.
RINDERKNECHT,H.,GEOKAS,M.C.,SILVERMAN,P.& HAVERBACK,B.J.,1968: A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity.-Cin.Chem.Acta 21,197-2o3.
SCHEURER,R.,1969a:Haemolymph proteins and yolk formation in the cockroach L e u c o p h a e a m a d e r a e.-J.Insect Physiol.15,1673-1682.
- 1969b:Endocrine control of protein sythesis during oöcyte maturation in the cockroach L e u c o p h a e a m a d e r a e.-J.Insect Physiol.15,1411-1419.
SCHNEIDER,G.,194o:Beiträge zur Kenntnis der symbiontischen Einrichtungen der Heteropteren.-Z.Morph.Oekol.Tiere 36, 595-644.
SCHROEDER,H.,196o:Verdauungsinsuffizienz als Folge von Vitaminmangelzuständen.-Dtsch.Med.Journ.11,21-23.
SELMAIR,E.,1962:Beiträge zur Wirkung wachstumsfördernder Stoffe auf die Entwicklung der Blattiden(B l a t e l l a g e r m a n i c a L.).-Z.Parasitenkunde 21,321-362.
SINGH,P.& House,H.L.,197o:Antimicrobials:'safe'levels in a synthetic diet of an insect A g r i a a f f i n i s.-J. Insect Physiol.16,1769-1782.
SLÁMA,K.,1964:Hormonal control of haemolymph protein concentration in the adults of P y r r h o c o r i s a p t e r u s (Hem.).-J.Insect Physiol.1o,773-782.

- 1965:Effect of hormones on the respiration of body fragments of adult P y r r h o c o r i s a p t e r u s (Hem.). -Nature 205,416-417.
SOOS,K.,1966:Begasungsversuche mit Aethylenoxyd an Lebensmitteln zur Bestimmung der Gasrückstände.-Mitt.f.Lebensmittelunters. 57,192.
TELFER,W.H.& WILLIAMS,C.M.,1953:Immunological studies of insect metamorphosis.I.Qualitative and quantitative changes in the blood antigens of the cecropia silkworm.-J.Gen.Physiol.36, 389-413.
TERANDO,L.M.& FEIR,D.,1966:Protein concentration in the haemolymph of the large milkweed bug O n c o p e l t u s f a s c i a t u s.-Comp.Biochem.Physiol.18,163-168.
- 1967:Electrophoresis and immunodiffusion of proteins from haemolymph of the large milkweed bug O n c o p e l t u s f a s c i a t u s (Hem.).-Comp.Biochem.Physiol.20,431-436.
THOMAS,K.K.& NATION,J.L.,1966:Control of a sex-limited haemolymph protein by corpora allata during ovarian development in P e r i p l a n e t a a m e r i c a n a.-Biol.Bull. Wood's Hole 130,254-264.
THOMSEN,E.& MØLLER,Jb.,1959:Neurosecretion and intestinal proteinase activity in an insect C a l l i p h o r a e r y t h r o c e p h a l a Meig.-Nature 183 ,1401-1402.
- 1963:Influence of neurosecretory cells and of corpus allatum on intestinal protease activity in the adult C a l l i p h o r a e r y t h r o c e p h a l a Meig..-J.Exp.Biol. 40,301-321.
TÓTH,L.,1950:Protein metabolism and nitrogen fixation by means of microorganisms living in symbiosis with insects.-Proc. 8th.int.Congr.Entomol.Stockholm.
- 1951:Die Rolle der Mikroorganismen in dem Stickstoff-Stoffwechsel der Insekten.-Zool.Anzeiger 146,191-197.
WIGGLESWORTH,V.B.,1936:Symbiontische Bakterien bei der Verdau- und und Ernährung:R h o d n i s Hem..-Parasitology 28, 284-289.
- 1959:Physiologie der Insekten.-Birkhäuser Basel/Stuttgart.
WOLLMANN,E.,1926:Observations sur une lignée aseptique de blattes (B l a t e l l a g e r m a n i c a) datant de cinq ans.-C.r.Soc.Biol.95,164-165.

CURRICULUM VITAE

Als Tochter des Emil Sacher,Mittelschullehrer und der Rosa,geb. Amsler,wurde ich Käthi Geering-Sacher von Basel am 4.August 1944 in Bözen (Aarg.) geboren.Nach zwei Jahren Primarschule im Aargau wechselte ich meinen Wohnsitz nach Basel und absolvierte hier den Rest meiner Schulzeit.Im Jahre 1963 bestand ich die Maturität am Mädchengymnasium II in Basel.Anschliessend immatrikulierte ich mich an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät in Basel und studierte Zoologie im Hauptfach,mit den Nebenfächern Chemie,Bakteriologie und Botanik.

Vorlesungen und Kurse belegte ich bei folgenden Dozenten:

H.Erlenmeyer,S.Fallab,E.W.Flückiger,T.Freyvogel,M.Geiger-Huber,R.Geigy,C.Grob,C.G.Honegger,E.Lang,H.Löffler, H.Nüesch,A.Portmann,M.Reiff,P.Schmid,H.G.Seiler,Ch.Tamm, Tomcsik,H.Zoller.

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn PD Dr. M.Reiff an der Zoologischen Anstalt Basel.

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren PD Dr. Max Reiff und Prof.Dr. Werner Stingelin.

Basel, den 23. Nov. 1971

Prof.Dr. Hans P. Laubscher